

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики**

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ
(підпис)

«__» _____ 2020р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Екологічна біотехнологія та
біоенергетика»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія одержання ліпідів мукорових грибів»**

Виконав:
студент IV курсу, групи БЕ-61
Шмиговський Олександр Іванович _____

Керівник:
Асист. к.т.н.,
Левтун Ігор Ігорович _____

Консультант з проектування:
Проф., д.т.н, проф.,
Саблій Лариса Андріївна _____

Рецензент:
Асист., к.т.н.,
Карпенко Юрій Володимирович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.
Студент _____

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ
(підпис) (ім'я, прізвище)

«___» _____ 2020р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Шмиговський Олександр Іванович

1. Тема проєкту «Технологія одержання ліпідів мукових грибів»
керівник проєкту Левтун Ігор Ігорович, к.т.н., асист.,
затверджені наказом по університету від «___» _____ 20__ р. № _____
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: Необхідне виробництво ліпідів – 2,5 т/добу.
Культивування – безперервне. Спроекувати ферментер для
культивування мукових грибів.
4. Зміст пояснювальної записки: Вступ; Розділ 1 Огляд літератури;
1.1. Загальна характеристика мукових грибів; 1.1.1. Обґрунтування
вибору виду мукових грибів для подальшого отримання біомаси;
1.1.2. Характеристика продуцента; 1.1.3. Існуючі технології вилучення ліпідів
з грибів; 1.1.4. Вибір технології вилучення ліпідів мукових грибів; Розділ 2
Біосинтез цільової речовини; 2.1.1. Характеристика ліпідів як цільового
продукту; 2.1.2. Біохімія синтезу ліпідів; 2.2. Характеристика живильного
середовища для подальшого культивування; 2.2.1. Характеристика
живильних середовищ; 2.2.2. Склад живильних середовищ; 2.2.3.
Приготування живильних середовищ; 2.2.4. Обґрунтування вибору складу
поживного середовища для подальшого культивування; Розділ 3

Характеристика технологій культивування; 3.1.1.Характеристика технологій культивування мукових грибів; 3.1.2.Вплив фізико-хімічних факторів в процесі культивування на утворення ліпідів і їх жирнокислотний склад; 3.1.3.Обґрунтування вибору технології культивування; 3.1.4.Вибір ферментера та його обґрунтування; 3.1.5.Характеристика ферментера; Розділ 4 Технологічна частина; 4.1.Опис технологічного процесу; 4.2.Розрахунок виробничої потужності; 4.3.Визначення конструктивних параметрів апарата; 4.4.Розрахунок геометричних розмірів мішалки; 4.5.Розрахунок геометричних розмірів барботера; 4.6.Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування; 4.7.Розрахунок коефіцієнта масопереносу при механічному диспергуванні газу в рідині; 4.8.Матеріальний баланс; Розділ 5 Охорона праці та охорона довкілля; Висновки; Список використаної літератури; Додаток А.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): технологічна схема (А1), апаратурна схема (А1), ферментер (А1).

6. Консультанти розділів проекту*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проекту	д.т.н., проф. Саблій Л.А.		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Проведення літературних досліджень.		
2	Характеристика продуцента.		
3	Проведення аналізу існуючих технологій. Обґрунтування та вибір технології.		
4	Розрахунок параметрів культивування та виходу ліпідів. Розрахунок ферментера. Вибір обладнання.		
5	Розробка креслень апаратурної та технологічної схеми. Розробка креслення ферментера.		

* Консультантом не може бути зазначено керівника дипломного проекту

6	Опис заходів з охорони праці та довкілля.		
7	Оформлення пояснювальної записки та графічної частини.		

Студент

_____ Олександр ШМИГОВСЬКИЙ
(підпис)

Керівник проєкту

_____ Ігор ЛЕВТУН
(підпис)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект складається з 124 аркушів пояснювальної записки, з використанням 88 літературних джерел та 3 аркушів креслень А1. Пояснювальна записка складається з вступу, п'яти розділів, що містять 23 рисунки, 2 таблиць, висновки і список літературних посилань.

В роботі обрано та обґрунтовано технологію одержання ліпідів мукових грибів. В проекті наведено обґрунтування вибору технології безперервного глибинного культивування мукових грибів виду *Cunninghamella japonica*. Наведено характеристику продуценту та проаналізовано його фракційний склад. Розраховано матеріальний баланс процесу, наведено та описано технологічну та апаратурну схеми виробництва ліпідів, наведено поетапний опис технології отримання ліпідів мукових грибів та параметри контролю етапів процесу, охорона праці та довкілля. Обрано ферментер об'ємом 50 м³.

МУКОВІ ГРИБИ, CUNNINGHAMELLA JAPONICA, ЛІПІДИ,
ЖИРНІ КИСЛОТИ, ЕКСТРАКЦІЯ, ФЕРМЕНТЕР, ГЛИБИННЕ
КУЛЬТИВУВАННЯ.

ABSTRACT

The diploma project consists of 124 pages of explanatory note, using 88 references and 3 sheets of drawings A1. The explanatory note consists of an introduction, five chapters containing 23 figures, 2 tables, conclusions and a list of references.

The technology of obtaining lipids of flour fungi is selected and substantiated in the work. The project substantiates the choice of technology for continuous deep cultivation of flour mushrooms of the species *Cunninghamella japonica*. The characteristics of the producer are given and its fractional composition is analyzed. The material balance of the process is calculated, the technological and equipment schemes of lipid production are given and described, the step-by-step description of the technology of obtaining lipids of flour mushrooms and parameters of control of stages of the process, labor protection and environment are given. A 50 m³ fermenter was selected.

MUCOR MUSHROOMS, CUNNINGHAMELLA JAPONICA, LIPIDS,
FATTY ACIDS, EXTRACTION, FERMENTER, DEEP CULTIVATION.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	14
1.1. Загальна характеристика мукових грибів.....	14
1.1.1. Обґрунтування вибору виду мукових грибів для подальшого отримання біомаси.....	18
1.1.2. Характеристика продуцента.....	21
1.1.3. Існуючі технології вилучення ліпідів з грибів.....	25
1.1.4. Вибір технології вилучення ліпідів мукових грибів.....	33
РОЗДІЛ 2. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОЇ РЕЧОВИНИ.....	35
2.1.1. Характеристика ліпідів як цільового продукту.....	35
2.1.2. Біохімія синтезу ліпідів.....	40
2.2. Характеристика живильного середовища для подальшого культивування.....	42
2.2.1. Характеристика живильних середовищ.....	42
2.2.2. Склад живильних середовищ.....	44
2.2.3. Приготування живильних середовищ.....	47
2.2.4. Обґрунтування вибору складу поживного середовища для подальшого культивування.....	52
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕХНОЛОГІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ.....	57
3.1.1. Характеристика технологій культивування мукових грибів.....	57
3.1.2. Вплив фізико-хімічних факторів в процесі культивування на утворення ліпідів і їх жирнокислотний склад.....	63
3.1.3. Обґрунтування вибору технології культивування.....	65

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шмиговський			Зміст	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.		Левтун І.І.						
							7	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

3.1.4. Вибір ферментера та його обґрунтування.....	66
3.1.5 Характеристика ферментера.....	69
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	76
4.1. Опис технологічного процесу.....	76
4.2 Розрахунок виробничої потужності.....	82
4.3. Визначення конструктивних параметрів апарата.....	84
4.4. Розрахунок геометричних розмірів мішалки.....	87
4.5 Розрахунок геометричних розмірів барботера.....	88
4.6 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування.....	91
4.7 Розрахунок коефіцієнта масопереносу при механічному диспергуванні газу в рідині.....	95
4.8. Матеріальний баланс.....	100
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	101
ВИСНОВКИ.....	110
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	112
ДОДАТОК А.....	122

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Зміст	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шмиговськи						
Конс.		Левтун І.І.					8	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини;
 ЖК – жирні кислоти;
 ФЕА – фосфатидилетаноламін;
 ФХ – фосфатидилхолін;
 ВЖК – вільні жирні кислоти;
 ФК – фосфатидні кислоти;
 МЕЖК – метилові ефіри жирних кислот;
 ГЛ – гліколіпіди;
 рН – водневий показник;
 СФ – стерилізаційний фільтр;
 ГДВ – гранично допустимі викиди;
 ПУВ – попередньо узгоджені викиди;
 ГЛ – гліколіпіди;
 рН – водневий показник;
 СФ – стерилізаційний фільтр;
 ГДВ – гранично допустимі викиди;
 ПУВ – попередньо узгоджені викиди;

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шмиговськи			Перелік умовних позначень та скорочень	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.		Левтун І.І.						
							а	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

Вступ

В Україні є величезний потенціал для вирощування грибів, на даний момент гриби займають одне з провідних місць в розвитку сільськогосподарських підприємств. Вирощування грибів є практично безвідходною технологією, оскільки основною сировиною для приготування субстратів є відходи виробництв, після використання якої можна отримати важливі продукти, що застосовують в якості добрив. Також значну роль грибів можна відстежити в мікробіології та медицині, так як завдяки своєму складу, їх використовують в лікувальних цілях. Не менш важливим є виробництво біопалив з грибів, що позитивно впливає на екологічне становище та дає можливість усунути проблему з виснаженням запасів горючих копалин.

Властивість грибів (гетерогенність їх фізіолого-біохімічних властивостей) виявилися дуже зручними для біотехнологів, так як з цих нижчих еукаріотів виявилось можливим отримувати біологічно активні речовини (БАР), продуцентами яких раніше були тварини, рослини і бактерії. Наприклад, такі гормони рослин як гібереліни [1], абсцизову кислоту і фузікокцин тепер отримують з грибів.

В останнє десятиліття гриби розглядаються як найбільш прогресивні джерела отримання есенціальних жирних кислот - лінолевої і ліноленової, а також і арахідонової.

Актуальність.

На сьогодні велика кількість грибів використовується в якості лікувальних екстрактів, так одним із найбільш важливих напрямів дослідження в наш час є визначення можливості використання

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шмиговський			Вступ	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.		Левтун І.І.						
							10	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

препаратів з природної сировини в якості лікувальних засобів при онкологічних захворюваннях.

Можливість грибів нарощувати при глибинному культивуванні великі обсяги біомаси за порівняно короткий термін ферментації, дають можливість використовувати дешеві середовища (відходи інших виробництв), отримувати під час однієї ферментації кілька кінцевих продуктів, необмеженість виробництва і їх екологічна чистота – сприяє тому, що на даний момент саме гриби займають перше місце як найбільш використовувані продуценти в біотехнологічних виробництвах.

У свою чергу, розвитку таких біотехнологій сприяли дані про те, що гриби можуть служити джерелами для отримання цінних медичних препаратів. Ця галузь біотехнології зайняла в медицині до кінця 19 століття таку міцну позицію, що виділилася в окрему дисципліну, яка називається фармацевтичною мікологією, створенню цієї галузі медичної індустрії сприяли також значні успіхи у вивченні хімії природних з'єднань грибів та встановлення зв'язку між певними БАВ і їх медичним використанням. З'явилася навіть можливість прогнозувати препарати з певними медичними властивостями.

В останні роки мікологи, хіміки природних з'єднань, медики і біотехнологи, які тепер спільно створюють нові медичні препарати, звернули особливу увагу на імуномодуючу активність лікарських засобів, одержуваних з грибів. Згідно з сучасними даними, імуномодуляторами вважають будь-які речовини, які надають стимулюючий, або регуляторний вплив на імунну систему, а імунна відповідь організму спрямована на підтримку генетичної сталості його внутрішнього середовища (його гомеостазу) [2].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Постановка проблеми: пошук нових джерел отримання ліпідів, в тому числі на технічні потреби. Цим джерелом можуть стати гриби, ліпіди яких після відповідної обробки придатні до використання в різноманітних галузях промисловості: медичної, хіміко-фармакоцевтичної, лакофарбової, шинної і інших, що дозволяє вивільнити значну кількість біомаси, знайти можливі шляхи оптимізації процесу ліпідоутворення у найбільш перспективних штамів.

Вплив на ріст, розвиток і біохімічну активність мікроорганізмів складу середовища, температури, аерації, окисно-відновних властивостей, зміна цих факторів впливає на біосинтетичну діяльність мікроорганізмів, ліпогенну активність та на склад синтезуючих ліпідів.

В даний час антропогенний вплив на природу скорочує і забруднює природні місця проживання грибів. В результаті цього знижується врожайність грибів, їх харчова безпека.

Мета і задача роботи. Метою роботи є проектування технології одержання ліпідів з мукових грибів.

Для досягнення мети передбачено виконання таких задач:

1. Провести літературний огляд стосовно характеристики порядку грибів, умов, параметрів та технологій їх культивування, а також біосинтез ліпідів, біохімію процесу та вплив фізико-хімічних факторів в процесі культивування ліпідів.
2. Обґрунтувати вибір раціональних параметрів культивування грибів для отримання ліпідів.
3. Розрахувати технічні показники обраного типу ферментера для культивування грибів та матеріальний баланс.
4. Характеризувати пропозиції та заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля.
5. Розробити технологічну і апаратурну схеми культивування мукових грибів для одержання ліпідів.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

6. Розробити креслення обраного типу ферментера.

Об'єкт проекту. Процес культивування мукових грибів для одержання ліпідів.

Предмет проекту. Технологія культивування мукових грибів за використання ферментера

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика мукових грибів.

Порядок *Mucorales* – мукові.

До порядку відносяться види з добре розвиненим несептірованим міцелієм. При старінні іноді в гіфах утворюються перегородки. У деяких видів може бути дріжжеподібний ріст, зустрічається клітинний міцелій.

Безстатеве розмноження здійснюється нерухомими спорангіоспорами, укладеними в спорангіях на вертикально стоящих гіфах - спорангіеносцях. В межах порядку можна простежити поступовий перехід від розмноження спорами до розмноження конідіями. Статевий процес - типова зигогамія, що завершується утворенням зиготи в стані спокою - зигоспори. Зигоспори утримуються на субстраті з допомогою відходящих гіфів (суспензорія, підвіски) (рис.1.1). [3]

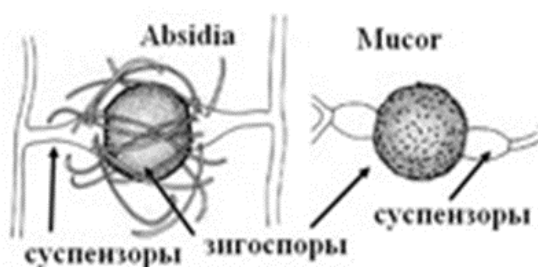


Рисунок 1.1. Зигоспора мукових грибів.

Іноді зигоспори оточені гіфами і формують своєрідні плодові тіла.

В основному сапротрофи, але можуть бути і паразити грибів, рослин, тварин і людини. В основу класифікації покладено особливості безстатевого розмноження.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ		
Розроб.	Шмиговський						
Конс.	Левтун І.І.						
Керів.	Левтун І.І.						
Затверд.							
					Стадія	Арк.	Акрушів
						14	124
					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		

Сімейство *Mucoraceae* (мукові)

Мукоралес - найбільший і найкраще вивчений порядок сімейства грибів зигоміцетів. Найбільш велике сімейство порядку. До порядку входять: 12–13 родин, 56 родів і приблизно 300 видів. Класифікація мукоралей традиційно базується на морфологічних, та екологічних характеристиках. Нещодавно молекулярні дані виявили, що деякі аспекти традиційної класифікації є досить штучними.

В основному сапротрофи, але можуть бути і паразити. Багато видів характеризуються високою ферментативною активністю, що використовується людиною, особливо в країнах азіатського континенту.

Рід *Mucor* (мукор).

M. mucedo зустрічається в ґрунті, на кінському посліді і викликає псування продуктів. Спочатку гриб розвивається в вигляді білого міцелію, помітного неозброєним оком. Над поверхнею міцелію незабаром піднімаються вертикальні гіфи, майбутні спорангії. Кінці гіфів розширюються, утворюючи спорангій кулястої форми, в якому цитоплазма по периферії ущільнюється і містить багато ядер.

Центральна частина його залишається менш щільною, не містить ядер і перетворюється в колонку. З вмісту периферичної частини формуються спори (мітоспори). Після розриву оболонки спорангія суперечки розсипаються, а на спорангійності залишається колонка з частиною стінки спорангія - комірцем.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		15

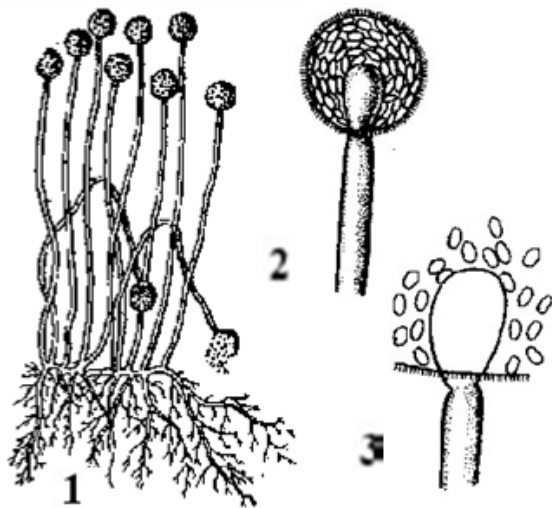


Рисунок 1.2. *Mucor* sp. 1 - міцелій і спорангієносцями зі спорангіями; 2 - спорангій зі спорами; 3 - колонка і спори.

Статеве розмноження можливо лише при зіткненні міцелія з різним статевим знаком («+» і «-»), так як вид є гетероталічним. Статевий процес - зигогамія.

Деякі види муко́ра є патогенними, наприклад *M. pusillum* вражає центральну нервову систему, органи слуху людини, *M. racemosus* викликає захворювання легенів у птахів. Муко́р зимовий (*M. hiemalis*) використовується для приготування продуктів з соєвого молока (процес кодзі).

Рід *Rhizopus* (різопус). Для нього характерна наявність спорангієносця темного кольору. У багатьох видів є столони, що дозволяють швидко освоїти субстрат. Гриби цього роду найчастіше поселяються на продуктах харчування і називаються чорна цвіль або головчатая цвіль, характеризуються високою ферментативною активністю, а також можуть продукувати органічні кислоти. *R. oryzae* викликає мікоз теплокровних тварин. Використовується у виробництві спирту і органічних кислот. *R. nigricans* містить пектинруйнуючі ферменти, тому застосовується для мацерації стебел льону в текстильній промисловості.

Рід *Absidia* (абсиді). Відрізняється від роду *різопус* тим, що спорангієносями з грушоподібними спорангіями відходять від середини дуги столону. *A. corymbifera* викликає бронхомікоз людини, може вражати центральну нервову систему. *A. septata* - збудник легневих мікозів, може поселятися в зовнішніх слухових проходах людини.

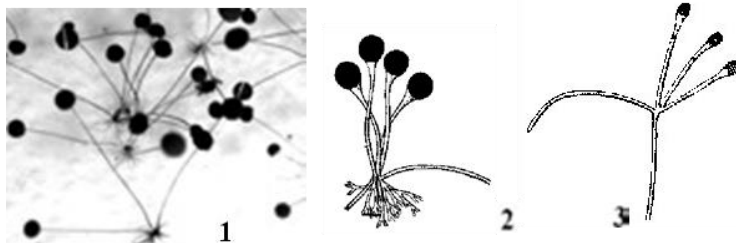


Рисунок 1.3. *Rhizopus* sp. : 1 - зовнішній вигляд колонії; 2 - пучок спорангієносями зі спорангіями, ризоїдами і столонами. *Absidia glauca*.

1.1.1. Обґрунтування вибору виду мукових грибів для подальшого отримання біомаси.

Здатність різних видів різностатевих штамів *Cunninghamella* до синтезу ліпідів. Виходячи з припущення, що штами мукових грибів, наприклад *Blakeslea trispora*, здатні при спільному культивуванні (+) і (-) штамів утворювати у багато разів більше нейтральних ліпідів, ніж при окремому вирощуванні [4].

Показники біомаси штамів *C. echinulata*, а також *C. homothallica*, і накопичення ними ліпідів представлені в табл. 1.1. Як видно з табл. 1.1, всі досліджувані штами грибів за 5 діб зростання накопичують більше 15 г/л біомаси.

Таблиця 1.1. Показники біомаси і виходу ліпідів в гетероталлічних штамів *C. echinulata* і гомоталлічного штаму *C. homothallica*

Організм	Біомаса, г/л	Ліпіди	
		%	г/л
<i>Cunninghamella echinulata</i> ВКМ F-626 (-)	16.44	41.92	6.89
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-657 (-)	14.15	47.73	6.75
<i>C. japonica</i> ВКМ F-1204 (-)	19.16	42.37	8.12
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-470 (-)	15.54	44.23	6.87
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-471 (+)	15.44	40.58	6.26
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (-)	18.35	43.21	7.93
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-776 (+)	16.02	37.82	6.06
<i>C. homothallica</i> ВКМ F-930	20.49	44.08	9.03
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (-) + F-776 (+)	18.20	39.50	6.81

Вміст ліпідів в міцелії всіх штамів перевищує 35%, але спільне культивування не збільшило вміст ліпідів в міцелії продуцентів, що ще раз підтвердило існування фізіологічних властивостей між грибами сімейств *Cunninghamellaceae* і *Choanephoraceae* [5].

Аналіз складу жирних кислот та ліпідів досліджуваних штамів (рис. 1.4.) показав присутність насичених і ненасичених жирних кислот C14-C20 з переважанням пальмової, олеїнової і лінолевої кислот, сумарний вміст C20 жирних кислот становив менше 2% [6].

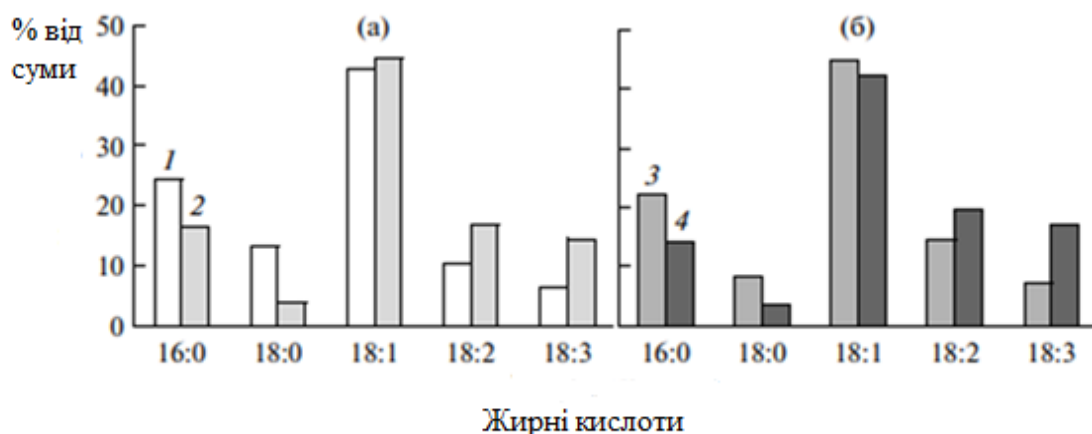


Рисунок. 1.4. Склад (% від суми) жирних кислот в ліпідах гетероталлічних штамів *Cunninghamella echinulata*.

а: 1 – ВКМ F470 (-); 2 – ВКМ F471 (+); б: 3 – ВКМ F775 (-); 4 – ВКМ F776 (+).

Цікавим видається той факт, що всі штами, незалежно від їх статевої приналежності, синтезували лінолеву кислоту (C18:3). Більш того, на відміну від інших мукорових грибів, наприклад *Blakeslea trispora* [7], (+) штами *Cunninghamella* синтезували більше C18:3, ніж (-) штами.

Так, різке збільшення (по над чим в два рази) для ліноленової кислоти: в штамі 471 (+) у порівнянні з 470 (-) - з 6.58 до 14.69%, а в штаму 775 (+) у порівнянні з 776 (-) з 7.31 до 17.09%. Підвищення вмісту лінолевої кислоти та знижування пальмітинової і стеаринової кислот може вказувати на велику активність десатураз в сем. *Cunninghamellaceae*, відповідальних за синтез C18:2 і C18:3 кислот відповідно. [8].

Таким чином, досліджений різностатевий штам *Cunninghamella* характеризувався у порівнянні з іншими *Mucorales* (наприклад, *B. trispora*) більш високим вмістом ненасичених жирних кислот. Всі штами

Cunninghamella синтезували лінолеєву кислоту, при цьому вміст даної кислоти в ліпідах (+) штамів перевищував відповідний показник (-) штамів більш ніж в 2 рази. [8].

Таким чином, показано, що існують відмінності в метаболізмі ліпідів в порядку грибів *Mucorales*. На відміну від інших *Choanephoraceae*, в представників роду *Cunninghamella* не тільки не збільшувався вихід нейтральних ліпідів при популяціях різностатевих штамів, але (+) і (-) штамми мали практично ідентичний складу жирних кислот [9]. Всі досліджені штами володіли можливістю накопичувати ліпіди, вміст яких в міцелії перевищував 35-38%. За складом і вмістом жирних кислот розглянуті ліпіди можна віднести до олеїнового типу [9].

Обрано активний продуцент ліпідів мукоровий гриб *Cunninghamella japonica*, що містить в якості джерела азоту нітрат амонію, що дозволяє отримувати до 16 г/л біомаси і більше 7 г/л ліпідів. У ліпідах гриба переважає олеїнова кислота (до 50% від суми жирних кислот), йодне число 86.61. Теплотворна здатність ліпідів 37.13 МДж/кг відповідає аналогічному показнику рапсового масла. Використання стимуляторів проростання конідій *C. japonica* дозволяє скоротити терміни ферментації і ліпідоутворення. [10].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

1.1.2. Характеристика продуцента

Таксономічне положення об'єкта:

Царство: *Fungi*

Клас: *Zygomycetes*

Порядок: *Mucorales*

Сімейство: *Cunninghamellaceae*

Рід: *Cunninghamella*

Вид: *Cunninghamella japonica* (сучасна назва *Cunninghamella echinulata*)



Рисунок 1.5. *Cunninghamella echinulata*.

Рід *Cunninghamella*.

Безстатеве розмноження здійснюється односпоровою, з шиповатою оболочкою спорангіолою (конідіями), утворюються на вбитих вершинах конідієносцев. Спора, що знаходиться всередині спорангіоли, має власну товстостінну оболочку[11].

Гриби роду *Cunninghamella* відносяться до найнижчого міцеліального гриба, представляючи клас *Zygomycetes*. Представники даного роду - сапрофіти,

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

частіш за все зустрічаються в середземноморських та субтропічних зонах. Представники роду розвиваються у ґрунті, на плодах, семенах, в гниючих субстратах рослинного походження, деякі види можуть бути оппортуністичними [12].

Головною морфологічною особливістю роду *Cunninghamella*, що відрізняє їх від інших представників порядку *Mucorales* є наявність моноспорового спорангія. Особливістю спори є наявність двошарової стінки, що робить цей рід подібним із вищими грибами [12].

Варто відзначити також особливе значення цих грибів у біотехнології, особливо при отриманні ізопреноїдних сполук, наприклад, убіхінонів [13].

Cunninghamella echinulata - грибковий вид роду *Cunninghamella*. Для нього характерне безстатеве розмноження і мезофільний спосіб життя, віддаючи перевагу середнім температурним діапазнам. Оскільки *Cunninghamella echinulata* є забруднювачем повітря, в даний час в галузі біотехнології існує інтерес через його здатність синтезувати гамма-ліноленову кислоту, а також його здатність до біоаккумуляції металів. Цей вид є сапротрофом, який утворює ризоїди, віддаючи перевагу азоту, фосфору та збагаченому ґрунтом калію [14].

Cunninghamella echinulata є членом сімейства Cunninghamellaceae (*Mucormycota*). Цей вид тісно зв'язаний з *C. Elegans*, і обидва види мають досить схожі характеристики росту та морфології. Колонія росте на більшості середовищ, в центрі колонії виростає щільний, білий або сіруватий повітряний міцелій. *Cunninghamella echinulata* відтворюється безперервно та виключно за допомогою колючих одинарних спорангіолів, які через характер спорангіоспор, що утримуються у спорангіях, виглядають як двошарова зовнішня стінка [14]. Цей гриб росте за допомогою ниток, що не мають перегородок. Це загальна риса представників *Mucormycota*, у яких гіфальні відділення повністю розділені

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

септою або повністю неперервні та багатоядерні. Зигоспори цього гриба виробляються тільки після злиття гаметангій сумісних штамів, що є прикладом гетероталічної системи спарювання. Спорангіофори цього виду нерівномірно розгалужені і не схожі на спорангіоспори, характерні для більшості інших членів *Micormycota*, що зустрічаються в подібних місцях існування. У спорангіолів цей отриманий гриб більший (10 - 20 мкм), ніж у споріднених видів, *C. elegans* [14].

Cunninghamella japonica та інші види *Cunninghamellaceae* можна вибірково вирощувати на агаризованому середовищі Чапека [15]. Однак в залежності від поживних речовин, до яких додається агар, можуть змінювати окиснометаболічний профіль цього гриба.

Хоча цей гриб є мезофільним (переважно проміжні температури росту), він здатний виростати між 6°C і 45°C, хоча швидкість росту біля крайніх температур є мінімальною [15]. Оптимальна температура для розвитку зигоспор становить від 25°C до 35°C [16]. Цей вид виявляє різний характер росту в залежності від впливу навколишнього середовища. При рН=5,5, грибок росте у невеликих щільних гранулах, але більш типовий, нитчастий ріст досягається при рН=8,0 [16]. Присутність індол-3-оцтової кислоти в середовищі стимулює лінійний ріст [15,16].

Цей грибок був досліджений для використання у виробництві запасуючих ліпідів (наприклад, γ -ліноленова кислота). Для досягнення найбільшого виходу продукту, *Cunninghamella japonica* необхідно вирощувати на виснажених за концентрацією азоту середовищах з молярним співвідношенням C/N = 169 [16]. *C. japonica* також здатний вибірково приймати і вилучати металеві забруднювачі з забруднених вод, що передбачає потенційне використання в біоремедіації забрудненої води. Проте його роль як агента може бути обмеженим опортуністичною характеристикою. Наявність активної системи

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

монооксигенази дозволяє цьому виду виконувати окислювальне деметилювання та гідроксилювання [17]. Гриб володіє цитохромною системою р450, подібною до того, що існує в організмі людини, що робить його потенційно корисною моделлю для дослідження обміну речовин у печінці [17].

Також, даний вид має антибактеріальний ефект проти *Staphylococcus aureus* та *Salmonella typhus*, розповсюджених агентів шкірних інфекцій та харчового отруєння, відповідно *C. japonica* не виробляє мікотоксинів [17].

Захворювання, спричинені цим грибом та іншими видами *Mucorales*, називають мукомікозом, що характеризується швидко-прогресуючою та деструктивно-інвазивною хворобою з відносно низьким виживанням [18]. Однак цей вид вважається виключно опортуністичним патогеном, що інфікує людей з погіршеним станом здоров'я. Люди з хворобами, такими як ВІЛ-інфекція та діабет, мають підвищений ризик розвитку мукомікозу. Вважається, що інфікування *C. japonica* виникає при вдиханні грибкових спор і не є інфекційними [18].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		24

1.1.3. Існуючі технології вилучення ліпідів з грибів

Технологічний процес отримання ліпідів, на відміну від отримання білкових речовин, обов'язково включає стадію виділення ліпідів з клітинної маси методом екстракції в неполярному розчиннику (бензині або ефірі). При цьому отримують одночасно два готових продукта: мікробний жир (біожир) і знежирений білковий препарат (біошрот) [19].

Сировиною для цього процесу є ті ж середовища, що і для виробництва кормової біомаси. У процесі культивування мікроорганізмів на різних середовищах виходять три класи ліпідів: прості, складні ліпіди і їх похідні. [20].

Прості ліпіди - нейтральні жири і воски. Нейтральні жири (основні запасні компоненти клітини) - ефіри гліцерину і жирних кислот, основна маса яких триацилгліцериди (але також й моно- і дигліцериди). Воски - ефіри жирних кислот або монооксикислот і аліфатичних спиртів з довгим вуглецевим ланцюгом. За структурою і властивостями близькі до нейтральних ліпідів. Найбільша кількість нейтральних ліпідів синтезують дріжджі і міцеліальні гриби. Прості ліпіди знаходять застосування як технологічні мастила в процесах холодної і теплової обробки металів. Продуцентами складних ліпідів є в основному бактерії. [21].

Складні ліпіди діляться на дві групи: фосфоліпіди і гліколіпіди. Фосфоліпіди (фосфогліцериди і сфінголіпіди) входять до складу різних клітинних мембран і беруть участь в перенесенні електронів. Їх молекули полярні і при $pH = 7,0$ фосфатна група несе негативний заряд. Концентрат фосфоліпідів знаходить застосування в якості антикорозійної присадки до олив і як добавка при флотації різних мінералів. Гліколіпіди на відміну від фосфоліпідів не містять молекул фосфорної кислоти, але також є сильно

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

полярними сполуками за рахунок наявності в молекулі гідрофільних вуглеводних груп (залишків глюкози, манози, галактози і ін.) [22].

До похідних ліпідів відносять жирні кислоти, спирти, вуглеводні, вітаміни Д, Е і К. Жирні кислоти представлені насиченими і ненасиченими кислотами з одним подвійним зв'язком і парним числом вуглецевих атомів (пальмітинова, стеаринова, олеїнова). Серед дієнових жирних кислот можна виділити лінолеву. Подвійні зв'язки в ненасичених жирних кислотах мікробних ліпідів часто розташовуються так, що ділять їх на частини, число вуглецевих атомів в яких кратно трьом. Очищені монокарбонові кислоти з числом вуглецевих атомів 14-18 знаходять широке застосування в миловарній, шинній, хімічній, лакофарбовій та інших галузях промисловості [23].

Модифікація та підвищення точності визначення ліпідів у біологічному матеріалі можливі шляхом попередньої екстракції і отримання прозорого розчину ліпідів для їх наступної ферментативної оцінки.

При виборі методу екстракції необхідні приймати в увагу ряд особливостей ліпідів. Ліпідами називають клас органічних речовин, гетерогенних по хімічній структурі, але володіючих загальною властивістю - високою розчинністю в неполярних розчинниках, так вони мають гідрофобний характер. Серед них відрізняють нейтральні ліпіди (вільні жирні кислоти і їх ефіри, моно, ди і триацилгліцерини, стероїди, воски, вуглеводні) і полярні ліпіди (гліцерофосфоліпіди, сфінго і гліколіпіди, цереброзиди). Тому при екстракції ліпідів беруть до уваги, що вони здатні не тільки до гідрофобних взаємодій, але і к утворенню водневих, електростатичних і ковалентних зв'язків(ефірних, амідних, глікозидних). Відносний вплив на зв'язки: неполярні розчинники (хлороформ, бензол, діетиловий ефір) руйнують комплекс, утворенні гідрофобними взаємодіями в живій тканині, хіломікрони, комплекси альбумінів

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

з жирними кислотами; полярні розчинники (етанол, метанол) руйнують водневі та електростатичні зв'язки. Полярні розчинники застосовують у суміші зі слабополярними розчинниками при екстракції ліпідів з плазматичних мембран, мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула печінки. Ліпіди, що знаходяться в комплексах, утвореними ковалентними зв'язками, розчинниками не екстрагуються. Їх можна виділити тільки після гідролізу з використанням органічного розчинника. [24,25].

Найбільш поширеним методом екстракції ліпідів є метод Фолча [26], при якому застосовується суміш хлороформ - метанол (2: 1) з розрахунка 20 частин екстрагуючої суміші на одну частину тканини. Метод дозволяє виділити 90–95% усіх клітинних ліпідів. Суміші розчинників, що містять спирт, також екстрагують неліпідні речовини (цукри, амінокислоти, солі та ін.). Для видалення неліпідних домішок екстракт ліпідів промивають водою або слабкими сольовими розчинниками. Однак це призводить до втрати частини кислих ліпідів [27].

Так як ліпіди легко піддаються окисненню і гідролітичній деградації, щоб затримати ці процеси, екстракцію ліпідів проводять при кімнатній температурі, застосовуючи розчинники, з яких попередньо видаляється кислород. Видаленні ліпіди не випаровують насухо і не залишають в випарюваному вигляді на довгий час, а відразу розчинюють. Екстракти ліпідів слід зберігати в плоско закритій посуді при -20 °С і нижче в присутності інертних газів. Можна застосовувати антиоксиданти, наприклад, 2,6-ди-трет-бутил-крезол, які у концентрації 0,005% ефективно запобігають окисному розщепленню ненасичених ліпідів.

Деякі розчинники містять або накопичують при зберіганні речовини, руйнуючі ліпіди. Так, при зберіганні діетилового та петролейного ефіру накопичуються пероксиди, окислюючі подвійні зв'язки. При зберіганні

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		27

хлороформа та дихлорметана утворюється фосген, реагуючий з окси- та аміногрупами. Невеликі кількості альдегідів, що містяться у первинних спиртах, також реагують з окси- та аміногрупами та активізують метиленові групи [28,29].

Щоб видалити домішки розчинники піддають спеціальній обробці. Свіжий хлороформ переганяють і зберігають у темній склянці з додаванням 1%-го метанола або етанолу. Хлороформ після тривалого зберігання промивають водою, сушать над хлористим кальцієм і переганяють. Метанол і етанол (95 або 99%) переганяють над гранульованою гідроокисом калію, зберігають у темній склянці 1-2 місяця [29].

Процедура екстракції ліпідів повинна приводити до кількосного вилучення клітинних ліпідів у незмінному вигляді. Ліпідний екстракт не повинен бути забрудненим неліпідними речовинами, такими як цукри та амінокислоти. Ефективність екстракцій ліпідів у значній степені залежить від хімічної природи ліпідних компонентів і від видів комплексів, які створюють ліпіди в клітині з іншими класами природних з'єднань [30]. Відомі три основних типи взаємодії ліпідів з іншими речовинами:

- I тип - ван-дер-ваальсово взаємодія між гідрофобними «нейтральними» або неполярними ліпідами, такими як ефіри стеринів, гліцериди, вуглеводні, каротиноїди, які зв'язуються відносно слабкими нековалентними зв'язками, їх вуглеводні ланцюги створюють зв'язки з іншими ліпідами або з гідрофобними ділянками білків. Така взаємодія здійснюється в жировій тканині, хіломікронах, комплексах альбуміна з жирними кислотами, жировими утвореннями мікробних клітин;

- II тип взаємодії - утворення водневих зв'язків, електростатична або гідрофобна взаємодія, при яких полярні ліпіди (фосфатиди, гліколипіди,

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

холестерин) створюють зв'язки з білками, наприклад, в плазматичних мембранах, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулі;

- III тип взаємодії - створення комплексів, у яких жирні кислоти (нормальні або розгалужені) і оксикислоти зв'язані ковалентними зв'язками (складноєфірними, амідними або глікозидними) з полісахаридами, як це має місце в ліпополісахаридних клітинних стінок бактерій. Із комплексів, створених у результаті ван-дер-ваальсової гідрофобної взаємодії, ліпіди можна екстрагувати відносно неполярними розчинниками, такими як етиловий ефір, хлороформ або бензол. Ліпіди зв'язані в мембранах, екстрагуються полярними розчинниками, такими як етанол або метанол, розриваючи водневі зв'язки і порушуючи електростатичні взаємодії білків з ліпідами. Ковалентно зв'язані ліпіди не екстрагуються ніякими розчинниками: їх можна виділити шляхом розщеплення комплексу з допомогою кислотного або лужного гідролізу.

При виборі методу екстракції необхідно прийняти до уваги здатність ліпідів до перекисного окислення за подвійним зв'язком. Зазвичай, щоб попередити окислення подвійних зв'язків, безпосередньо перед екстракцією розчинниками переганяють і видаляють із них перекисі. Розчинники, що застосовуються для виділення ненасичених ліпідів, слід дезаерувати, пропускаючи через них азот, і потім усі операції проводять в атмосфері азоту. Ліпідні екстракти не слід висушувати насухо, не залишати в випарюваному вигляді на довгий час; виділені ліпіди потрібно як можна швидше розчиняти у відповідному розчиннику (хлороформі). Температура, при якій проводиться екстракція, повинна бути не вище кімнатної (або нижче, якщо це необхідно) для того, щоб уповільнити окислення і гідролітичне розщеплення ліпідів.

Старі способи екстракції киплячим розчинником в апараті Сокслета повинні бути виключені [31-33].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		29

Головними недоліками традиційного Сокслет - екстрагування є: тривалий час екстрагування; велика кількість використовуваного розчинника; Сокслет пристрій не забезпечує перемішування для прискорення процесу; велика кількість використовуваного розчинника вимагає процедуру випаровування і конденсації; можливість термічного розкладання цільових компонентів, оскільки вилучення зазвичай відбувається при температурі кипіння розчинника протягом тривалого часу.

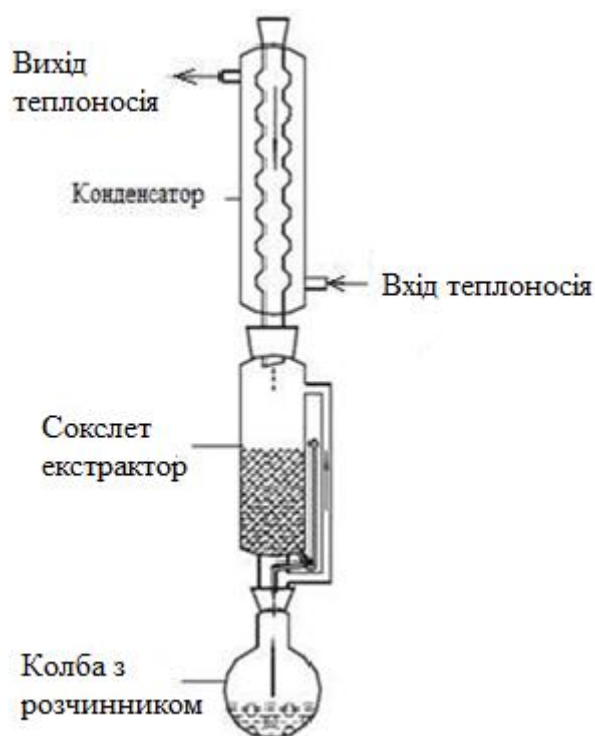


Рисунок 1.6. Апарат Сокслета для екстрагування [32].

Другий фактор, на який слід звернути увагу, це ферментативна деградація ліпідів під час екстракції. Так, наприклад, розчинники що містять спиртові суміші викликають дезактивацію більшості фосфатаз та ліпаз. Більш стабільні ферменти руйнуються при 1-2-х хвилинному контакті з киплячою водою або гарячим спиртом [34-37].

Спирт є необхідним компонентом всіх сумішей, використовуваних для екстракції ліпідів, так як він розриває складні ліпіди з білками, розчиняє ліпіди і дезактивує ферменти, що викликають розщеплення ліпідів. Не дивлячись на те, що суміш розчинників, які містять спирт, на ряду з ліпідами екстрагують неліпідні речовини, що містяться в клітинах, такі як цукри, амінокислоти, солі та ін. Таким чином, неочищений ліпідний екстракт потрібно обробляти так, щоб видалити всі водорозчинні домішки. Найбільш поширеною процедурою такого роду є промивка екстрактною водою, яка веде в деяких випадках до утворення дуже стабільних емульсій. Звільняючи ліпіди від неліпідних домішок, пропускаючи неочищені екстракти через колонки, заповнені целюлозою або сефадексом, або проводять діаліз через спеціальні мембрани.

Серед раніше відомих способів визначення ліпідів слід відмітити метод екстракції з наступною подальшою тонкошаровою хроматографією; метод із використанням для часткової деліпідизації ліпопротеїнів крові в низьких концентраціях (0,1%) неіонного детергенту Тритона Х-100 [38], також можливість виділення ліпідів по методу Фолча.

Одним з найбільш часто використовуваних та ефективних способів екстракції ліпідів є екстракція по Блайю і Дайєру - спрощений варіант класичної методики Фолча. При екстракції за цим методом використовують однофазну систему розчинників хлороформ-метанол-вода, яка швидко і ефективно вилучає ліпіди. Екстракт розбавляють одним об'ємом води і одним об'ємом хлороформа. В результаті утворюється двофазна система, нижній шар якої складається з хлороформу, верхній - із суміші метанола та води. Водорозчинні неліпідні домішки переходять у водометанольний шар, у той час як у хлороформному шарі залишаються ліпіди, практично вільні від забруднень.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

До сучасних інтенсивних методів екстрагування можна віднести наступні: модифікована рідинна екстракція (ЖЕМ), надкритична флюїдна екстракція, субкритична екстракція водою, ультразвукова екстракція. ЖЕМ - це процес вилучення в системі тверде тіло - рідина, який протікає при підвищених температурах від 50 до 200 °С і тиску від 10 до 15 МПа. Екстракцію проводять під тиском, щоб підтримати модифікатор в рідкому стані при високій температурі. Розчинник при цьому залишається нижче його критичного стану. Підвищення температури підсилює кінетику екстрагування, а підвищений тиск утримує розчинник в рідкому стані. Високий тиск дозволяє швидше вилучати з'єднання з заповненої клітини, а підвищення температури покращує дифузію розчинника, що призводить до інтенсифікації екстрагування [38-41]. Типова схема екстрагування методом ЖЕМ приведена на рис.1.7.

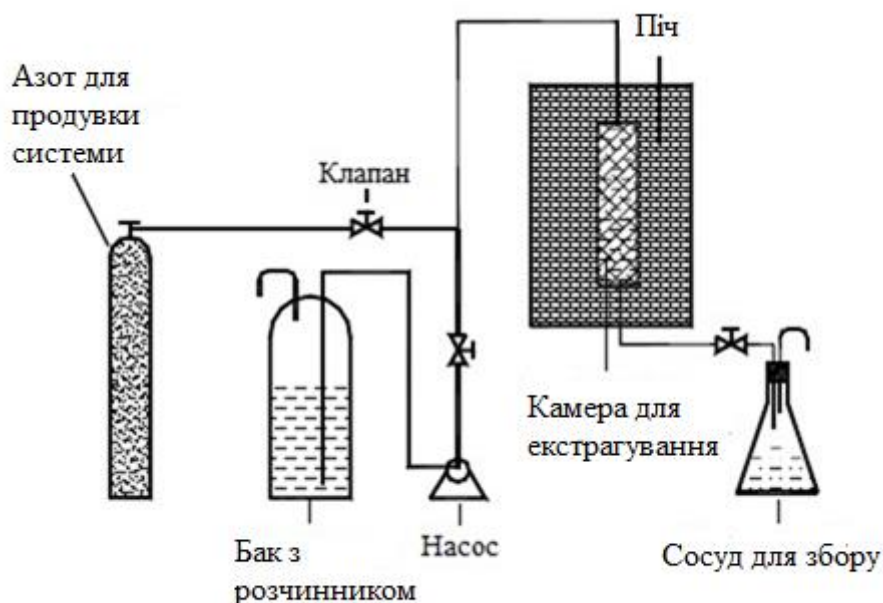


Рисунок 1.7. Типова схема екстрагування методом ЖЕМ [31].

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

1.1.4. Вибір технології вилучення ліпідів мукових грибів.

В останнє десятиріччя отримала великий розвиток екстракція різних речовин за допомогою надкритичних флюїдів. При екстракції ліпідів прийнятим способом за методом Фолча використовується хлороформ, що володіє канцерогенною дією [42].

Було проведено вилучення ліпідів надкритичним діоксидом вуглецю при наступних параметрах екстракції (80-100 °С, 50 МПа) з біомаси *S. japonica* F-1204 (-). Кількість вилучених ліпідів склав 45% (від сухої ваги) при 80 °С і 60% при 100 °С. Кількість ліпідів, вилучених за методом Фолча із застосуванням розчинників, не перевищував 45%. ГРХ аналіз складу жирних кислот підтвердив ідентичність ліпідного складу, екстрагованого за методикою Фолча.

Надкритична флюїдна екстракція найбільш ефективна з точки зору максимального збільшення повноти вилучення [38-41]. У порівнянні з рідкими розчинниками, надкритичні флюїди мають кілька переваг:

- 1) розчинна здатність надкритичного флюїдного середовища розчинника залежить від щільності, яка регулюється шляхом зміни тиску і температури;
- 2) надкритична рідина має більш високий коефіцієнт дифузії в порівнянні з рідкими розчинниками, що призводить до кращої масовіддачі [43].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		33

Висновки до розділу.

В цьому розділі був розглянутий порядок нижчих грибів *Mucorales*, обрано активний продуцент ліпідів муковий гриб *Cunninghamella japonica*, який містить в якості джерела азоту нітрат амонію, що дозволяє отримувати до 16 г/л біомаси і більше 7 г/л ліпідів. У ліпідах гриба переважає олеїнова кислота (до 50% від суми жирних кислот). Підібраний найбільш раціональний метод екстракції, а саме екстракція надкритичним CO₂, яка дозволяє не тільки виключити використання хлороформу, але і забезпечує більш повне вилучення ліпідів з біомаси.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		34

РОЗДІЛ 2. Біосинтез цільової речовини

2.1.1. Характеристика ліпідів як цільового продукту

Ліпіди - це група різномірних за хімічною будовою органічних речовин, загальною властивістю яких є їх нерозчинність у воді.

Ліпіди бувають прості і складні. Прості складаються з двох компонентів (наприклад, нейтральні жири містять гліцерин і жирні кислоти), а складні - більш ніж з двох.



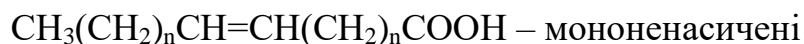
Рисунок 2.1. Класифікація ліпідів.

До простих ліпідів відносяться жири (тригліцериди або нейтральні жири) і воски. Їх обов'язковий компонент - жирні кислоти.

Жирні кислоти (ЖК) - це монокарбонові кислоти з одним аліфатичним ланцюгом, тобто що складаються з однієї карбоксильної групи і довгого неполярного хвоста. Жирні кислоти природних ліпідів, як правило, містять

					ЕКБ.БЕ6122.ДП		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2 Біосинтез цільової речовини		
Розроб.	Шмигзовський						
Конс.	Левтун І.І.						
Керів.	Левтун І.І.						
Затверд.							
					Стадія	Арк.	Акрушів
						35	124
					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		

парну кількість атомів вуглецю. Жирні кислоти поділяються на насичені або ненасичені. Насичені кислоти не містять подвійних зв'язків. Ненасичені кислоти містять одну (мононенасичену) або кілька (поліненасичених) подвійних зв'язків:



Подвійні зв'язки в природних поліненасичених жирних кислотах – ізольовані. Як правило, зв'язки мають цисконфігурацію, що надає таким молекулам додаткову жорсткість. Це має біологічний сенс, тому що такі молекули входять до складу клітинних мембран. З ненасичених ЖК найчастіше зустрічаються пальмітинова і стеаринова [44].

Жирні кислоти нерозчинні в воді, температура плавлення знижується зі збільшенням числа подвійних зв'язків і укороченням ланцюга.

Такі жирні кислоти, як ліолева, ліоленова і їм подібні (з двома і трьома подвійними зв'язками), не синтезуються всередині організму людини і називаються незамінними. Тому їх необхідно отримувати з їжею.

При цьому полієнові кислоти ділять на дві групи: ω -3 і ω -6 (в залежності від положення подвійного зв'язку від вуглецевого атома останнього, метильної групи). Ці кислоти є попередниками різних груп гормонів місцевої дії - ейкозаноїдів. Так, ліолева кислота є прикладом ω -6 кислот. Як приклад ω -3 кислот можна привести ейкозапентаєнову кислоту, C20: 5 (ω -3) [45].

Фосфоліпіди і сфінголіпіди входять до складу клітинних мембран і визначають їх проникність для іонів, неелектролітів і води. Цереброзиди і гангліозиди беруть участь в процесах розпізнавання хімічних сигналів і доведення їх до внутрішньоклітинних ефекторів, тобто виконують рецепторно-

посередницьку роль. Ліпідам властива також регуляторно-сигнальна функція, яка виконується, головним чином, ліпідними спиртами (стероїдами). Численні дослідження показали, що між порушенням метаболізму ліпідів і багатьма захворюваннями (наприклад, серцево-судинними) є тісний взаємозв'язок [48].

Крім того, поряд з ліпідами в ліпідній фракції міститься ряд речовин, що володіють високою біологічною активністю. До таких належать стероїдні гормони, простагландини, коферменти та жиророзчинні вітаміни. Їх об'єднують під загальною назвою низькомолекулярні біорегулятори ліпідної природи. Таким чином, вивчення структури і властивостей ліпідів важливий етап у вивченні біохімічних процесів.

За хімічним складом ліпіди дуже різноманітні. До їх складу можуть входити залишки спиртів, карбонових кислот (насичених і ненасичених), фосфорної кислоти, азотистих основ, вуглеводів.

Незважаючи на всю різноманітність, в цілому, ліпіди побудовані за єдиним принципом і складаються з трьох фрагментів: гідрофобної, гідрофільної і сполучної ланки. Гідрофобна частина представлена вуглеводневими фрагментами карбонових кислот. Гідрофільна частина може включати в себе залишки фосфорної кислоти (фосфоліпіди), азотистих основ (фосфатиди) або вуглеводів (цереброзидів, гангліозидів). Роль сполучної ланки виконують зазвичай складноефірні або амідні групи. Таким чином, ліпіди в різній мірі володіють біфільністю, тобто спорідненістю до полярної і неполярної фази. Характер цюї спорідненості визначається співвідношенням гідрофільної і гідрофобної частин ліпіда. Так, триацилгліцериди, практично не мають гідрофільної частини, переважно концентруються в безводній фазі [48]. Фосфоліпіди і фосфатиди мають в своєму складі більшу кількість гідрофільних груп, внаслідок чого здійснюють свої функції на межі розділу фаз. Так, на

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

поверхні клітин вони утворюють ліпідний бішар товщиною близько 5 нм, в якому гідрофобні частини звернені всередину, а гідрофільні у водну фазу. Цей шар регулює водний баланс і обмін речовин в клітинах.

Схематично структуру ліпідів можна поставати в такий спосіб:

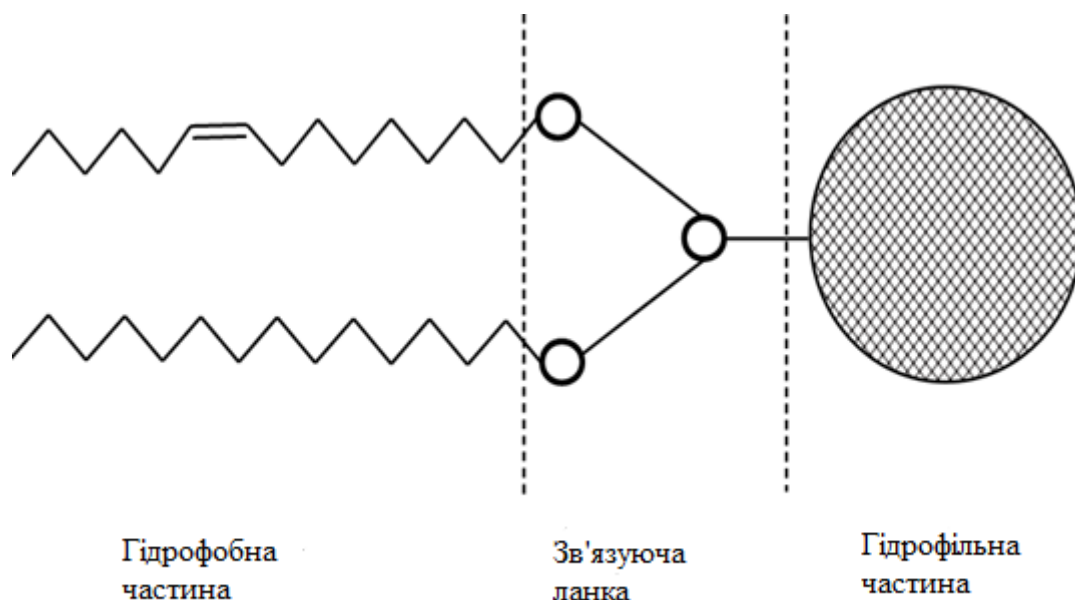


Рисунок 2.2. Загальна структура ліпідів.

У ліпідах клітинних стінок, а також цілих клітин міцелію і клітин в стані спокою представників мукорових грибів виявлено кількісні та якісні відмінності. Так, цілі клітини міцелію містили більше ліпідів, ніж в клітинній стінці. На відміну від спор екзогенного спокою спорангіоспор і конідій найбільшу кількість ліпідів, представлених триацилгліцеридами (70%), містили зиготи. [49].

Склад клітинних ліпідів мукорових грибів містив більше триацилгліцеринів (ТАГ) і менше полярних ліпідів, ніж ліпіди аскоміцетів. Всі дослідженні клітинні стінки та клітини міцелію мали подібний склад жирних кислот (ЖК), проте їх співвідношення індивідуально для кожної структури: в клітинній стінці і в клітинах міцелію переважала ліолева кислота, а в спорах олеїнова, що особливо помітно для клітин конідій. Для клітинної стінки на

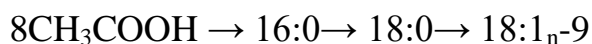
відміну від цілої клітини, характерно те, що масивними ліпідами можуть бути не фосфатидилетаноламін (ФЕА) і фосфатидилхолін (ФХ), а вільні жирні кислоти (ВЖК), стерини у вільній і етерифікованій формі, фосфатидні кислоти (ФК), метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК) і гліколіпіди (ГЛ), що свідчить про особливу функціональну значимість клітинної стінки [49].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

2.1.2. Біохімія синтезу ліпідів.

Біосинтез жирних кислот.

Практично всі організми здатні синтезувати з ацетату пальмітинову кислоту і перетворювати її в стеаринову та олеїнову:



Перетворення жирних кислот відбувається під дією ферментів – елонгаз (подовжені ланцюги) та десатураз (введення подвійних зв'язків) [50]. У грибів олеїнова кислота може перетворюватися у полієнові кислоти з тією ж кількістю атомів вуглецю:

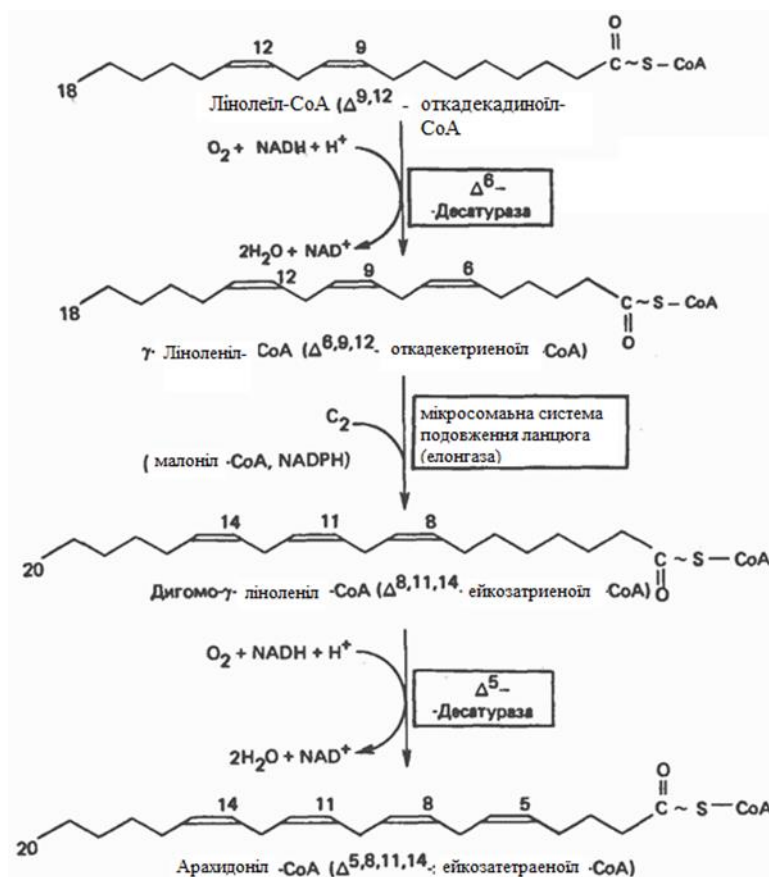
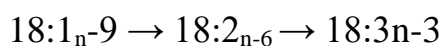


Рисунок 2.3. Шлях перетворення лінолеату в арахідонат [51].

На першому етапі перетворення відбувається дегідрування лінолеїл-КоА з утворенням -лінолената, який потім за участю мікросомальної системи

подовження ланцюга взаємодіє з малоніл-СoА і подовжується на 2 атома вуглецю; в результаті утворюється ейкозатрієноат (дигомоуліноленат). Останній піддається дегідруванню до арахідонової кислоти [52].

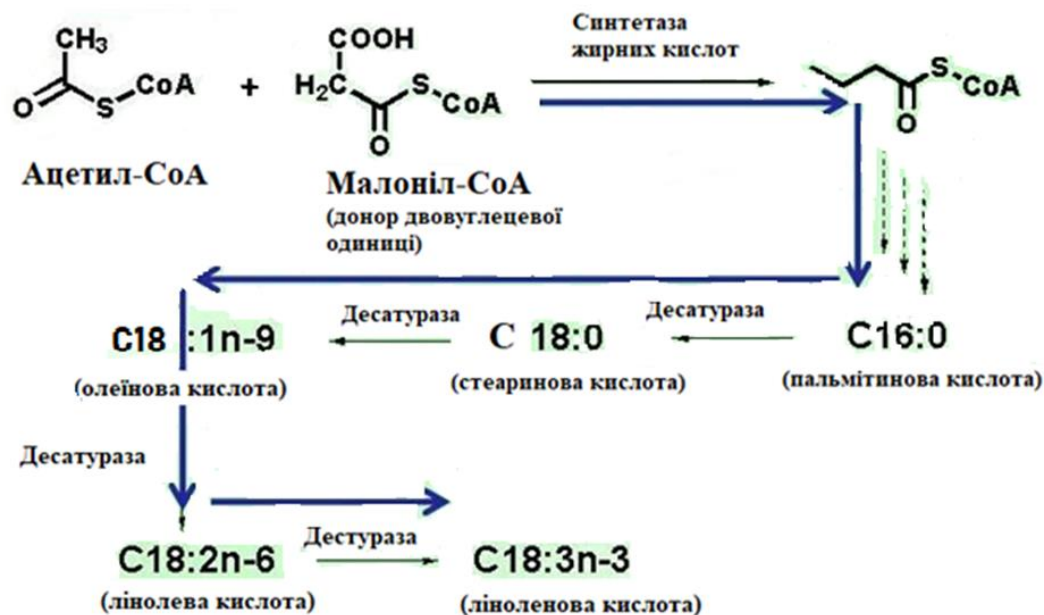


Рисунок 2.4. Біосинтез жирних кислот грибів.

2.2. Характеристика живильного середовища для подальшого культивування.

2.2.1. Характеристика живильних середовищ.

Живильне середовище - речовина або суміш речовин, які застосовуються для культивування макро- і мікроорганізмів. Існує безліч стандартних біологічних поживних середовищ.

Живильні середовища розрізняються за складом, призначенням і консистенцією.

По складу середовища для культивування ділять на три групи: природні або натуральні, штучні або напівсинтетичні, і синтетичні середовища.

Натуральними називають середовища, які складаються з продуктів тваринного і рослинного походження. До таких середовищ відносяться овочеві або фруктові соки, тканина тварин, розведена кров, молоко, вода морів, озер і мінеральних джерел, а також відвари або екстракти, отримані з природних субстратів, як, наприклад, м'ясо, гній, ґрунт, різні частини рослин. На натуральних середовищах добре розвиваються багато мікроорганізмів, так як в таких середовищах є, як правило, всі компоненти, необхідні для їх росту і розвитку. Однак ці середовища мають складний і непостійний хімічний склад, тому малопридатні для вивчення фізіології обміну речовин мікроорганізмів, оскільки не дозволяють врахувати споживання ряду компонентів середовища і утворення продуктів обміну по ходу розвитку. Натуральні середовища використовуються головним чином для підтримки культур мікроорганізмів, накопичення їх біомаси і діагностичних цілей.

Прикладами натуральних середовищ невизначеного складу, які широко застосовуються в лабораторній практиці, служать мясопептонний бульйон, пивне сусло, дріжджове і картопляне середовище, ґрунтова витяжка і інші.

У лабораторних умовах чисті грибні культури отримують при виділенні з досліджуваного матеріалу методами механічного роз'єднання і

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

культивування на штучних поживних середовищах. Гриби ростуть повільніше бактерій, видимий ріст їх колоній на твердих поживних середовищах зазвичай спостерігається на 3-5-й день. Утворення колоній грибів на твердих поживних середовищах - результат апікального росту головного гіфу і його відгалужень [53].

Гриби мають виражену сахаролітичну активністю, тому їх вирощують на спеціальних середовищах, що містять вуглеводи:

- середовище Сабуро;
- сусло-агар;
- морквяний агар та ін.,

При цьому рН середовища має становити 6,0-6,5.

Для росту грибів необхідні солі фосфору і сірки, накопичити велику біомасу грибів для промислових цілей дозволяють добавки іонів міді, магнію і натрію, вітамінів: біотину, рибофлавіну, тіаміну [54].

Гриби ростуть в широкому діапазоні температур (20-45 °С), гриби, що викликають захворювання людини, зазвичай культивуються при температурі 37 °С. При рості багатоклітинних грибів на поживних середовищах розрізняють субстратний міцелій (вирощуючі колонії, більша частина в середовищі) і повітряний міцелій (більша частина його знаходиться над живильним середовищем). З повітряним міцелієм пов'язано утворення конідій, з субстратним - бласто-, хламідо- і артроспор [54].

2.2.2. Склад живильних середовищ

Компоненти поживних середовищ також впливають на швидкість проростання конідій, на величину біомаси і утворення нових спор.

Найбільш загальним стимулюючою проростання речовиною є глюкоза, вона сприяє значному прискоренню набухання і проростання конідій *C. japonica*, в 1,5-2 рази збільшує кількість пророслих спор *A. niger*, як на фосфатно-цитратному буфері, так і в бідистилюваній воді, глюкоза одна може стимулювати проростання конідій певних штамів *M. anisopliae*.

Слід зазначити, що метаболізм вуглеводів не тільки видо-, але і штаммоспецифічний. Наприклад, штами *M. anisopliae*, виділені з *Coleoptera*, не використовують глюкозу в якості поживного субстрату для ініціації проростання спор, тоді як штами, виділені з *Hemiptera* і *Lepidoptera*, здатні засвоювати глюкозу [55]. На проростання конідій культури *B. bassiana* вуглеводи (глюкоза, сахароза, крохмаль) надають інгібуючий вплив [55].

Крім глюкози стимулюючу дію, але в меншій мірі, здатні надавати рибоза, ксилоза і маноза (на *C. japonica*), D-рибоза, D-фруктоза, L-арабіноза, D-ксилоза, D-глюкоза, D-галактоза, D-маноза; гліцерин, D-арабіт, D-маніт, мезо-інозит; сахароза, тригалоza, мальтоза (на *A. niger*). Слабку інгібуючу дію надає фруктоза, але разом з глюкозою вона навіть стимулює ріст у *C. japonica*. Аналоги глюкози – 6-дезоксид-глюкоза і 2-дезоксид-глюкоза повністю інгібують проростання спор [56].

На противагу вуглеводам більшість азотовмісних речовин чинять інгібуючу дію на ріст спор більшості видів. Дріжджовий екстракт і белкозин створюють сильний інгібуючий ефект на процес росту у *C. japonica*. Пептон викликає сильне набухання спор і затримує другу фазу проростання. З усіх перевірених азотовмісних речовин тільки L-пролін сприяє інтенсифікації проростання [57].

Прикладом виду, ріст якого стимулюється речовинами які містять азот може служити *A. niger*. Додавання пептона, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , Ласпарагіна, L-проліну, L-треоніну, L-цистеїну, L-метіоніну, L-серину,

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

D-глюкозаміну в 3-5 разів збільшує кількість пророслих спор. Це відрізняє досліджений штам *A.niger* від інших грибів, у яких проростання екзогенних спор в стані спокою стимулюється більшою мірою вуглеводами, ніж азотними сполуками [57].

У дії стимуляторів відзначається видоспецифічність. Так, спори *C. japonica* активно ростуть при додаванні проліна і міристинової кислоти, але додавання пептона помітно інгібує процес. Ріст ентопатогеного гриба *Metarhizus anisopilae* можна викликати шляхом культивування на декстрозному агарі і додаванням 0,03% твіна. Найбільш загальними сполуками, що активують ріст спор багатьох грибів, є АМФ і цАМФ.

Механізм стимулюючої дії активаторів проростання вивчений на прикладі *P. blakesleanus* [58]. Спокій цих спор можна порушити нагріванням або дією одноатомних органічних кислот. При цьому відбувається загальна стимуляція метаболізму, тобто дихання, синтез білків, РНК і компонентів КС. Цей процес супроводжується розподілом ядра і появою зародкової трубки. Перший ефект дії стимуляторів супроводжується збільшенням рівня цАМФ і змінами фосфодіестеразної активності. Активація цих ферментів може впливати на вміст гліцерину і трегалози. Трегалоза може використовуватися в процесі росту як джерело харчування, але попередньо метаболізувавшись в гліцерин. У той же час трегалоза втрачає свою функцію стабілізатора мембранних ліпідів, тому що склад останніх значно змінюється в процесі росту і відбувається збагачення клітин антиоксидантами [58].

Для забезпечення спрямованого біосинтезу ліпідів в живильному середовищі вживаються легкоасимілюючі джерела азоту.

На зрушення біосинтезу в бік утворення ліпідів або білка впливає співвідношення вуглецю та азоту в середовищі. Так, підвищення концентрації азоту викликає зниження ліпідоутворення, а недостача азоту при забезпеченості вуглецем веде до зниження виходу білкових речовин і високому процентному вмісту жиру. Встановлено, що оптимальне співвідношення N: тим менше, чим важче доступне для грибів джерело

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

вуглецю. Зазвичай для вуглеводневої сировини співвідношення N:C = 1:30, а для вуглеводного – 1:40. Накопичення ліпідів можливе тільки за наявності в середовищі фосфору. При його недоліку джерела вуглецю використовуються не повністю, при надлишку – накопичуються неліпідні продукти. На фракційний склад ліпідів зміна вмісту фосфору впливу не надає. Вплив інших елементів середовища (мікро- і макроелементів) позначається на інтенсивності зростання грибів і швидкості утилізації джерела вуглецю, що впливає і на кількість накопичених ліпідів, але не на їхню якість [59].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

2.2.3. Приготування живильних середовищ.

Для приготування середовищ використовують екстракти і відвари поживних природних субстратів, а також цілий ряд складних штучних середовищ різного складу. Як правило, всі вони готуються з використанням агар-агару, так як таке середовище має цілий ряд переваг. Наприклад, на поверхні агар-середовища дуже легко помітити забруднення основної культури сторонніми мікроорганізмами. У цьому випадку вони можуть бути своєчасно видалені і не представляти перешкоди подальшому процесу [60].

Для приготування середовища може використовуватися будь-який з наступних складів.

Сусло-агар: 200 мл неохмільеного пивного сусла розводять в 400 мл води, 20 г агар-агару розплавляють в 400 мл води, злегка охолоджують і змішують з розчиненим суслом.

Картопляно-глюкозний агар: 200 г очищеної і нарізаної картоплі кип'ятять в 500 мл води не менше 2 годин, розплавляють 17 г агар-агару в 500 мл води, відвар картоплі проціджують в агар і додають 20 г глюкози.

Вівсяний агар: 75 г вівсяного борошна повільно нагрівають протягом години в 500 мл води на водяній бані, 17 г агар-агару розплавляють в 500 мл води і змішують з процідженим вівсяним відваром.

Морквяний агар: екстракт моркви - 400 мл, вода - 600 мл, агар - 15 м. Подрібнена морква змішується з водою в співвідношенні 2:5, відварюється протягом 30 хвилин, фільтрується.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Крім наведених прикладів поживних середовищ є і ряд інших, але найчастіше вживається сусло-агар.

Найважливішим елементом приготування живильних середовищ є дотримання вимог асептики. Це, як правило, повна стерилізація всіх потоків, що подаються, і самого біореактора, або створення такого значення рН, яке забезпечує пригнічення сторонніх мікроорганізмів [61].

При приготуванні живильних середовищ потрібно враховувати можливість їх інфікування сторонніми мікроорганізмами. Джерелом інфекції можуть бути навколишнє повітря, вода, компоненти живильного середовища, забруднений посуд і обладнання. Тому вживають заходи для знищення живих мікроорганізмів і запобіганню їх попадання під час зберігання і проведення досліджень в живильному середовищі [61].

Обробка, при якій досягається повне звільнення від живих мікроорганізмів, в тому числі і від спорових форм, називається стерилізацією [61].

Живильні середовища знезаражують за допомогою різноманітних методів. Найбільш поширені термічні методи, при яких поживні середовища нагріваються і витримуються при певній температурі протягом часу, достатнього для стерилізації. Зазвичай поживні середовища стерилізують обробкою насиченою водяною парою під тиском в автоклавах - судинах, призначених для роботи під тиском. Живильні середовища перед стерилізацією паром під тиском (автоклавуванням) розливають в чистий посуд не більше ніж на половину її місткості і закривають ватно-марлевими пробками і паперовими ковпачками. Ємкості з живильним середовищем поміщають в автоклав, в який подається водяна пара. Після видалення з автоклава повітря і заповнення його паром закривають паровий клапан і контролюють температуру і тиск в автоклаві.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Тривалість обробки залежить від температури і об'єму стерилізуемого середовища. Невеликі об'єми рідини (приблизно до 3000 см³) можна простерилізувати при 115 - 117 °С (0,7 МПа) протягом 30 хв, для стерилізації великих об'ємів потрібна більш тривала обробка. Деякі компоненти живильного середовища можуть не витримати тривалу обробку при підвищених температурах (понад 100 °С), тому доводиться знижувати температуру стерилізації [62].

Однак при температурах 100 °С і нижче багато спорових форм мікроорганізмів залишаються життєздатними і для їх знищення використовують дробну стерилізацію. Сутність дробної стерилізації полягає в тому, що стерилізуємий матеріал нагрівають і витримують при певній температурі протягом часу, достатнього для знищення вегетативних клітин, потім охолоджують і витримують при 18-37 °С. Спорові форми при цій температурі проростають і перетворюються у вегетативні, які при повторному нагріванні загинуть [62]. Дробну стерилізацію при 100 °С проводять текучим паром, використовуючи автоклав з відкритим паровипускним клапаном. Дробна стерилізація при 60-80 °С називається тиндалізацією. Недоліком дробної стерилізації є можливість утворення спорових форм вегетативними клітинами, що утворилися з пророслих спор. Слід зазначити, що цей недолік можна використовувати для виділення спороутворюючих чистих культур в так званому методі, який має назву пастеризація. Одноразовий нагрів при 60- 80 °С вбиває безспорові мікроорганізми. Пастеризацію проводять при 60 - 75 °С тривалістю 15 - 30 хв або при 80 °С 10 - 15 хв. Іноді нагрівають до 90 °С і відразу ж охолоджують. Пастеризацію широко застосовують в промисловості при переробці харчових продуктів [62].

Для стерилізації живильного середовища, що містить термолабільні компоненти, можна використовувати "холодну" стерилізацію ультрафільтцією.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

При стерилізації ультрафільтрацією рідке середовище продавлюється (0,1 - 1,0 МПа) через мембранний фільтр, що затримує мікроорганізми і спори. Мембранні фільтри являють собою пористі матеріали - мембрани з розмірами пор 0,01 - 0,10 мкм. Стерилізують їх в дистильованій воді автоклавуванням або тривалим кип'ятінням. Більш прості у використанні азбестові і скляні фільтри, які затримують клітини мікроорганізмів не тільки механічно, а й частково через адсорбцію на стінках пор. Для стерилізації використовують вітчизняні азбестові фільтри марки "СФ" (стерилізаційний фільтр) у вигляді пластинок товщиною 3 - 5 мм і діаметром 35 і 140 мм. Перед вживанням азбестові пластинки монтують в спеціальний фільтрувальний апарат-прилад Зейтца, що складається з двох частин: металевого або скляного порожнього циліндра і нижньої частини з опорною сіткою. На опорну сітку кладуть азбестовий фільтр і обидві частини з'єднують гвинтами або зажимами. На трубку нижньої частини одягається гумова пробка, за допомогою якої вона вставляється в колбу з тубусом (колбу Бунзена). Приготований таким чином фільтр обгортається в папір і стерилізується в автоклаві. Живильні середовища стерилізуються і далі зберігаються в посудинах (колби, пробірки), закритих ватними пробками і паперовими ковпачками. Ватні пробки перешкоджають попаданню всередину мікроорганізмів з навколишнього повітря і навпаки, але в той же час вони повинні бути досить пористими для забезпечення газообміну з навколишнім середовищем. Для виготовлення пробок використовують гігроскопічну вату, яку розривають на довгі вузькі смуги відповідної величини. Смуги кладуть на стіл і загинають всередину бокові сторони або всі чотири края так, щоб вийшла рівна стрічка шириною близько 4 - 5 см (в довжину пробки). З стрічки скручують валик необхідного діаметра і відривають залишок стрічки. Правильно виготовлена пробка повинна легко входити в пробірку (колбу), щільно прилягати до її стінок, не порушуючи газообміну між вмістом пробірки і зовнішнім середовищем. Форма пробки не повинна змінюватися після вилучення з

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

посудини. Ватні пробки обтягують марлею, така ватно-марлева пробка більш зручна і має більш тривалий термін використання. Пробки готують і підбирають до посудин заздалегідь до розливу живильного середовища і стерилізації [63].

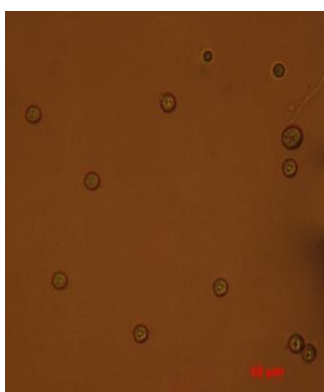
					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

2.2.4. Обґрунтування вибору складу поживного середовища для подальшого культивування.

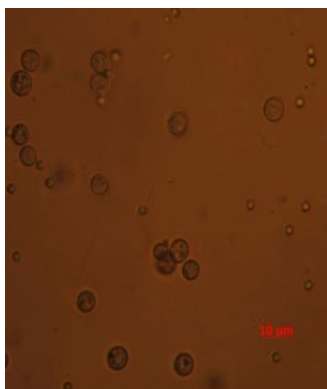
При вивченні проростання спор на середовищі сусло-агар встановлено, що спори через 1-1,5 години починають набухати, відбувається поступове збільшення діаметра спори. Ще через 1-1,5 години відбувається поява зачатків майбутніх росткових трубочок. До 3 годин з'являються паросткові трубочки, а до 5 години - паросткові трубочки є у 60-70% спор, у деяких спор по 2-3 трубочки. Діаметр спор збільшується протягом всього процесу проростання [64].

Характер росту спор на голодному агарі відрізняється від росту на сусло-агарі. Так, вже через 1 годину спори починають утворювати тонкі сильно розгалуджені гіфи. Також менш виражено збільшення діаметра спор на стадії набрякання. Ступінь росту на голодному агарі була більша в порівнянні з сусло-агаром, вже до 3 години майже всі спори проросли [64].

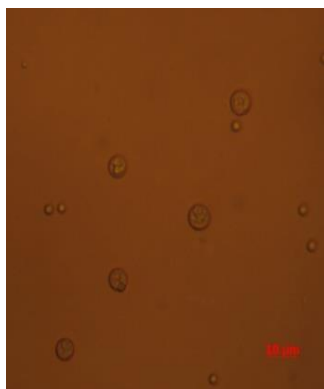
Виявлено залежність здатності до росту спор гриба від їх віку: відзначено зниження здатності росту в міру збільшення віку спори, особливо різко це зниження виражено між 21 і 28 добою [65].



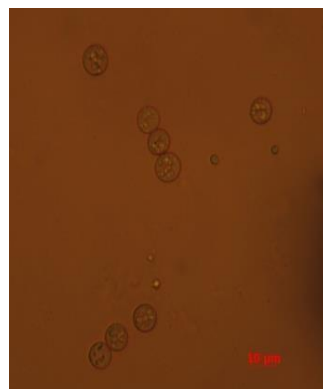
вихідні спори



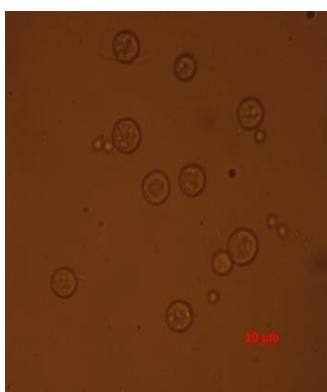
через 1 годину



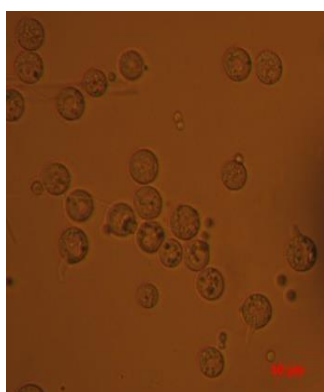
через 2 години



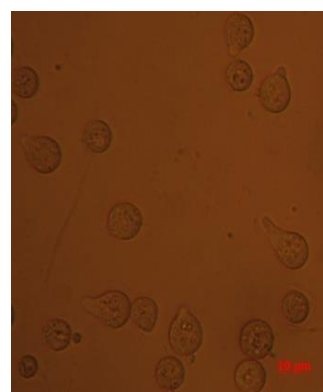
через 3 години



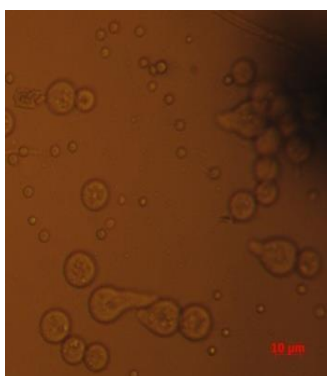
через 3,5 години



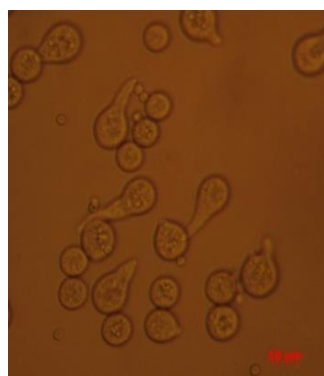
через 4 години



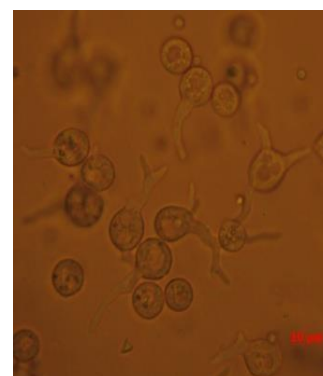
через 4,5 години



через 5 годин



через 5,5 годин



через 6 годин

Рисунок 2.5. Динаміка росту спор S. japonica на сусло-агарі.

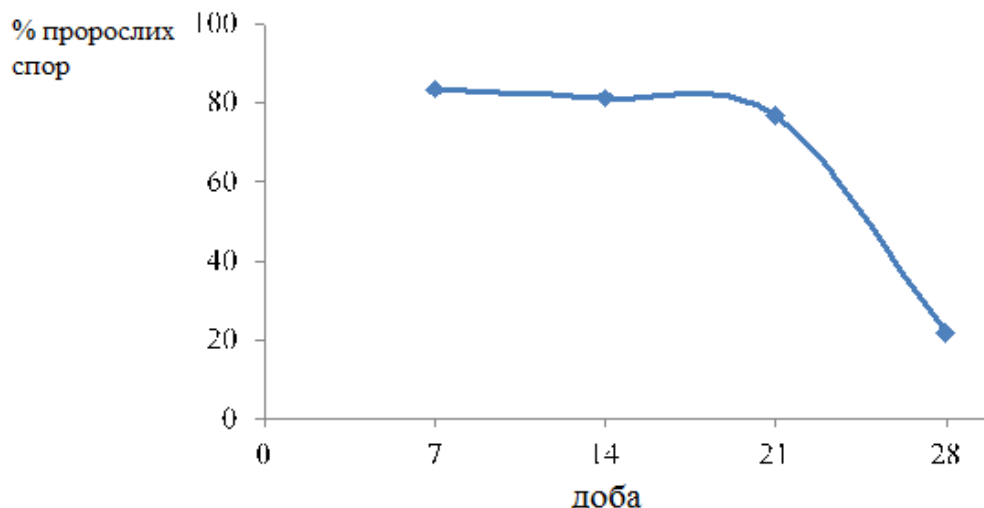


Рисунок 2.6. Збереження здатності до росту спор *C. jaronisa* в залежності від їх віку.

Було визначено, що основними елементами у середовищі для культивування мукорових грибів є глюкоза, нітрат амонію, сульфат магнію, дигідрофосфат калію, дріжджовий екстракт та N-ацетил-D-глюкозамін, що дозволяють накопичувати велику кількість біомаси. Оптимальне значення рН при рості спор *C. Jaronisa* повинно бути в межах 4-4,5. [66].

Вміст ліпідів в біомасі гриба *C. jaronisa*, вирощеного на середовищі з аспарагом, становив близько 50%. При використанні інших джерел азоту вміст ліпідів в біомасі був нижче. Так, найменше (11,96%) вміст ліпідів було відзначено на кукурузносоєвому середовищі, а найбільше (46,59%) - на середовищі з нітратом амонію [66].

На підставі отриманих даних про величину біомаси і вмісту в ній ліпідів був розрахований такий показник як вихід ліпідів з об'єму середовища (г / л). Найбільший вихід ліпідів, що перевищив контроль майже на 40%, був відзначений при культивуванні на середовищі Гудвіна [67].

В якості вихідного середовища доцільно використовувати середовище Гудвіна наступного складу (%): глюкоза - 5,0, аспарагін - 0,2, KH_2PO_4 - 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,025, дріжджовий екстракт - 0,1.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Висновки до розділу

Таким чином, найбільш сприятливим для росту гриба і накопичення клітинних ліпідів з усіх розглянутих джерел азоту є нітрат амонію, і вибір даної речовини в якості джерела азоту дозволив знизити собівартість середовища на 38%

Тому, за даними показників, було обрано поживне середовище Гудвіна, яке найбільше підходить для кращого накопичення біомаси обраного виду грибів.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

РОЗДІЛ 3. Характеристика технологій культивування

3.1.1. Характеристика технологій культивування ліпідів.

Культивування мікроорганізмів є одним з основних методів мікробіології. Від уміння культивувати мікроорганізми в лабораторних умовах в значній мірі залежать успіхи їх вивчення і практичного застосування. Культивування засноване на знанні метаболізму мікроорганізмів і розумінні значення фізико-хімічних умов середовищ, необхідних для їх життєдіяльності.

Для культивування мікроорганізмів (вирощування в штучних умовах *in vitro*) необхідні особливі субстрати - поживні середовища. На середовищах мікроорганізми здійснюють всі життєві процеси (харчуються, дихають, розмножуються і т.д.), тому їх ще називають «середовищами для культивування».

Живильні середовища є основою мікробіологічної роботи, і їх якість нерідко визначає результати всього дослідження. Середовища повинні створювати оптимальні (найкращі) умови для життєдіяльності мікроорганізмів.

Умови культивування мікроорганізмів:

Для росту мікроорганізмів істотне значення мають такі фактори: кислотність середовища, аерація, температура, світло, вологість. Розвиток мікроорганізмів можливий лише за певних умов кожного фактора, причому у різних груп мікроорганізмів ці межі часто неоднакові [68].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3 Характеристика технологій культивування	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шмиговські						
Конс.		Левтун І.І.						
							57	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

1) Кислотність середовища.

Кислотність (pH) середовища має вирішальне значення для вирощування багатьох мікроорганізмів. Більшість грибів краще росте при pH, близьким до 6,5. Значення pH середовищ може змінитися в процесі стерилізації, його слід перевірити, і, в разі необхідності, довести до потрібного за допомогою стерильних розчинів кислот (HCl, H₂SO₄), лугів (NaOH, KOH) або солей, що мають лужну реакцію (Na₂CO₃, NaHCO₃). Кислотність живильного середовища, сприятлива для початку росту мікроорганізмів, часто змінюється в процесі їх культивування. Ці зміни можуть бути результатом утворення продуктів метаболізму або нерівномірного споживання окремих компонентів середовища. Вимірюють pH електрометричним методом на потенціометрі. У лабораторній практиці зручно використовувати різні рідкі або паперові індикатори.

Проростання спор більшості видів грибів стимулюється слабокислими значеннями pH, наприклад, найбільш сприятливим для проростання спор *S. japonica* є значення pH 4,4 [68].

2) Аерація.

Кисень входить до складу води і багатьох сполук, тому надходить в клітини у великих кількостях. Значна частина мікроорганізмів потребує постійного притоку молекулярного кисню (облігатні аероби), для яких молекулярний кисень відіграє роль термінального окислювача. Розвиток інших мікроорганізмів навпаки, можливий тільки за відсутності кисню (облігатні анаероби). Отримання енергії у них не пов'язане з використанням молекулярного кисень, а для багатьох кисень навіть токсичний. Факультативні анаероби здатні рости як в присутності, так і у відсутності молекулярного кисню. Різні потреби мікроорганізмів у вільному кисні враховуються при виборі способу їх вирощування [68].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3) Температура.

Залежно від температурних параметрів виділяють три групи мікроорганізмів - термофіли, психрофіли і мезофіли.

Для термофілів (теплолюбних) зона росту від 45 °С до 80-90 °С, термофіли не здатні розмножуватися в організмі теплокровних тварин, тому медичного значення не мають.

Психрофіли (холодолюбиві) добре розвиваються в інтервалі температур 5-15 °С. Для вирощування психрофілів використовують холодильні камери.

До мезофілів відноситься більшість відомих форм мікроорганізмів, Температурний оптимум лежить в інтервалі від 25 до 37 °С.

Температурні зони загибелі мікроорганізмів широко варіюються. Вегетативні форми гинуть при температурі 60- 80 °С протягом години, при 100 °С - миттєво. Спори і цисти стійкі до температури 100 °С, гинуть при 130 °С і більш тривалій експозиції (до 2 годин). Нижня температурна межа загибелі мікроорганізмів варіюється від 20 °С (Збудники кору, коклюшу, сифілісу, менінгококової і гонококової інфекції) до абсолютного нуля. Шкідлива дія високої температури пов'язано з незворотною денатурацією ферментів мікроорганізмів, низької - з розривом клітинної мембрани кристалами льоду і припиненням метаболічних процесів [69].

Зміна температури може викликати активацію ферментів, що приводить до змін проникності мембрани [69].

Нагрівання при 50°С протягом 3 хвилин активує ріст спорангіоспор *P. Blakesleanus*. У цьому процесі бере участь клітинна стінка, при цьому в ній відбуваються різкі зміни в ліпідних зв'язках, що призводить до того, що

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

активовані спори не "лопаються" при нагріванні на відміну від тих що знаходяться в стані спокою.

Для видів, ріст яких ініціюється або активується підвищенням температури, значення температури і тривалість впливу специфічні, але при збільшенні часу впливу або температури відбувається зниження вираженості ефекту активації аж до повної втрати схожості. Також варто відзначити велику термостабільність стадій в стані спокою в порівнянні з міцелієм, і більшу стабільність ендогенно спочиваючих спор в порівнянні з екзогенно спочиваючими [69].

Як і по відношенню до більшості факторів, популяція спор відрізняється великою гетерогенністю до температури. Менше 0,5% спор *A. niger* не втрачають здатність до проростання після нагрівання до 98 °С, в той час як основна частина (50%) є термостабільним до 50 °С.

4) Світло.

Для зростання переважної більшості мікроорганізмів освітлення не потрібне. Навпаки, сонячні промені негативно впливають на їх розвиток, тому такі мікроорганізми вирощують в темряві. Вибір джерела світла визначається спектром його випромінювання або довжиною хвиль, при яких культивуючі мікроорганізми здійснюють фотосинтез (фототрофні мікроорганізми) [70].

Основний вплив на ріст надають синя і червона область спектра. Наприклад, опромінення світлом ($\lambda = 310-320$ нм) пригнічує ріст спори *S. japonica* і затримує цей процес в середньому на 2 години. Ріст спори *P. graminis* частково пригнічується білим світлом, основний вплив робить синя ($\lambda = 419-425$ нм) і червона область ($\lambda = 720$ нм) [70].

5) Вода.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Ріст мікроорганізмів неможливий без присутності в навколишньому середовищі води, причому вода повинна знаходитися в доступній для клітини формі, тобто рідкої фази. Доступність води в субстраті для росту мікроорганізмів виражають величиною активності води (a_w):

$$a_w = P / P_0,$$

де P - тиск пари над розчином, мм рт. ст. ;

P_0 - тиск пари над чистою водою при даній температурі.

Зменшення активності води призводить до збільшення часу проростання і падіння швидкості росту. Механізм впливу низької активності води на проростання спор до кінця не ясний. Передбачається, що в розчинах з високим осмотичним тиском відбувається вихід з спор в середовище невідомого фактора проростання. Також передбачається, що дегідратація призводить до перебудови ліпідних зв'язків в мембрані і подальшої втрати її проникності [71].

Аеробні мікроорганізми можна культивувати (виросувати) на поверхні рідких і щільних середовищ - поверхневе культивування або всередині рідкого живильного середовища - глибинне культивування. При поверхневому культивуванні кисень надходить в клітини мікроорганізмів безпосередньо з повітря, тому важливо збільшити площу зіткнення середовища з повітрям. Для цього середовища наливають тонким шаром в посуд з широким дном - чашки Петрі, колби Виноградського, матраці. Посів на щільні поживні середовища використовують для отримання ізольованих колоній і визначення чистоти культури. У разі якщо в досліджуваному матеріалі вміст мікроорганізмів незначний, то посів проводять на рідкі середовища збагачення. Для збільшення поверхні зіткнення живильного середовища з киснем повітря в глибинному культивуванні використовують качалки (шейкери), що забезпечують

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

струшування або обертання колб, пробірок. Чим більше частота обертання, тим більше зіткнення середовища з повітрям і вище насичення її киснем [72].

Існують два режими культивування мікроорганізмів в рідкому поживному середовищі: періодичне і безперервне (проточне). У разі періодичного культивування після інокуляції середовища в неї не додають і з неї не видаляють будь-які компоненти, крім газової фази

Посів - один з стаціонарних методів культивування мікроорганізмів на поживних середовищах, застосовується для культуральноморфологічної діагностики в медичній мікробіології, а також для дослідження біохімічних і біологічних властивостей в різних біотехнологічних цілях. Якщо в досліджуваному матеріалі вміст мікроорганізмів незначний, то посів проводять на рідкі середовища збагачення [72].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3.1.2. Вплив фізико-хімічних факторів в процесі культивування на утворення ліпідів і їх жирнокислотний склад.

При розгляді мікроорганізмів в якості потенційних джерел ліпідів необхідно взяти до уваги той факт, що на накопичення ліпідів, на їх жирнокислотний склад і на розподіл жирних кислот в ліпідних фракціях впливає ряд різних факторів. Кількість ліпідів і їх склад у грибів залежать від стадії росту: процес утворення ліпідів збігається за часом з накопиченням біомаси і закінчується в стаціонарній фазі росту культури, після чого вміст ліпідів починає зменшуватися [73].

Одним з важливих факторів, що визначають процес ліпідоутворення, є температура культивування. Для кожного гриба існує температурний оптимум розвитку культури. Однак він не завжди відповідає найбільш інтенсивному утворенню ліпідів. Зазвичай підвищення температури в певних межах супроводжується збільшенням загальної кількості ліпідів.

Крім того, для мукових грибів спостерігається пряма залежність між ступенем ненасиченості ліпідів і температурою культивування. Так культивування при знижених температурах призводить до збільшення активності $\Delta 12$ і $\Delta 15$ десатураз, відповідальних за синтез поліненасичених жирних кислот. Збільшення температури призводить до зниження відносного вмісту поліненасичених жирних кислот, і супроводжується збільшенням частки C18:1 C18:2. Температура впливає і на фракційний склад як нейтральних, так і полярних ліпідів, що вказує на наявність механізму адаптації до низьких температур. [74].

Як фракційний склад ліпідів, так і зміст окремих жирних кислот змінюється при синтезі, в залежності від якісного складу живильного середовища на якій був вирощений мікроорганізм.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Важливою характеристикою є співвідношення вуглецю і азоту (C / N) в середовищі культивування. Як уже зазначалося, накопичення ліпідів переважно відбувається в кінцевих фазах росту культури, коли кількість азоту в середовищі культивування дуже мало або даний компонент живильного середовища майже вичерпаний. Низький вміст азоту в середовищі сприяє синтезу ліпідів, приводячи в ряді мукорових грибів до переважного синтезу ненасичених жирних кислот. Отже, високе значення показника співвідношення C / N в середовищі сприяє посиленню синтезу ліпідів. [74].

Також слід підкреслити, що фракційний склад ліпідів змінюється в залежності від типу сполук азоту в живильному середовищі. Згідно, того якщо в середовищі азот присутній у вигляді нітратів, то збільшується вміст полярних ліпідів, тоді як частка триацилгліцеринів зменшується. Треба відзначити, що для кожного мікроорганізму характерні специфічні вимоги до форми і вмісту азоту в середовищі. Серед найбільш поширених сполук азоту, які використовуються в якості компонента живильного середовища, можна назвати дріжджовий екстракт, нітрат натрію, хлорид амонію, сечовина, нітрат амонію, сульфат амонію [74].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3.1.3. Обґрунтування вибору технології культивування.

В умовах глибинного культивування з інтенсивним перемішуванням (8,0-8,2 мг O_2 / л) і поверхневої культури (2,5-2,6 мг O_2 / л). Встановлено, що кількість кисню в середовищі значно впливає на ріст гриба. В умовах сильної аерації (глибинне культивування на качалці, швидкість обертання 250 об/хв) на середовищі з додаванням «затравки» отримано найвищий вихід біомаси.

При безперервному способі культивування в апарат постійно надходить живильне середовище, а з нього виходять продукти життєдіяльності разом з надлишком клітин [75].

Переваги безперервного культивування: висока продуктивність апарата; отримання якісно однорідного продукту; можливість повної автоматизації процесу; зниження витрат на обслуговування та виробничі площі; підтримка культури в активному стані протягом тривалого часу

Глибинний спосіб базується на вирощуванні мікроорганізмів у глибині середовища за рахунок кисню, розчиненого в рідині. Переваги глибинного культивування: непотрібність великих площ та громіздкого обладнання; простота обслуговування; можливість автоматизації; зручність виділення продуктів метаболізму. [75].

Таким чином, оптимальніше всього використовувати безперервне глибинне культивування, адже це не тільки вигідно з точки зору виробництва, але й може впливати на ріст та фракційний склад ліпідів.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3.1.4. Вибір ферментера та його обґрунтування.

Ферментери з механічним перемішуванням барботажного типу широко застосовуються для стерильних процесів вирощування мікроорганізмів - продуцентів біологічно активних речовин.

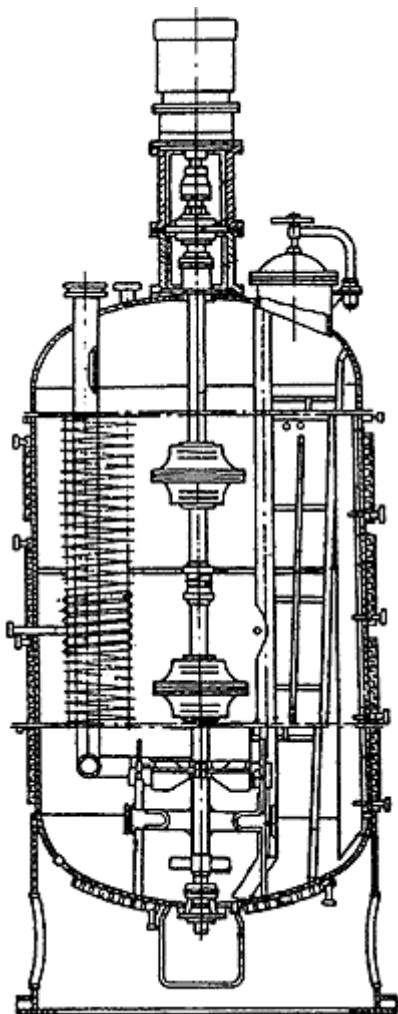


Рисунок 3.1. Ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу.

Ферментер такого типу являє собою вертикальний апарат циліндричної форми, виготовлений зі сталі Х18Н10Т або біметалу з еліптичною кришкою і днищем.

Відношення висоти до діаметра 2,6: 1. На кришці апарата розташований привід пристроя, що складається з електродвигуна, редуктора, муфти, підшипника і сальника. Тут же встановлені штуцери для завантаження живильного середовища і посівного матеріалу, подачі і виведення повітря, оглядові вікна, люки для занурення м'якої механічної головки; запобіжний клапан [76].

Для вивантаження культури в днищі апарату передбачений спускний штуцер. У середині корпусу знаходиться вал з закріпленими на ньому пристроєм, що складаються із закритих турбін. [76].

Барботер з'єднаний з трубою для підведення повітря і виконаний у вигляді розбірного ромба з перфорованих труб. У верхній його частині розташовані в шаховому порядку 2000-3000 отворів. Вал і перемішувачий пристрій з муфтами приводяться в обертання від мотор-редуктора.

Ферментер обладнаний сорочкою, що складається з 6-8 ярусів-секцій. Кожна секція складається з 8 каналів. Площа поверхні охолодження сорочки 60 м², внутрішня поверхня якої складається з змієвиків діаметром 600 мм і загальною висотою 2,4 м [76].

Ферментер розрахований для роботи під надлишковим тиском 0,25 МПа і стерилізації при 130-140 °С, а також для роботи під розрідженням. В процесі вирощування мікроорганізмів тиск всередині ферментера в межах 50 кПа; витрата стерильного повітря до 1 м³ / хв. Висота стовпа рідини в апараті 5-6 м при висоті апарату більше 8 м.

Для забезпечення стерильності процесу передбачені торцеві ущільнення вала. Торцеві ущільнення розраховані для роботи при тиску до 0,28 МПа і

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

остаточному тиску не нижче 2,7 кПа, температурі 30-250 °С і частоті обертання валу до 500 хв⁻¹ [77].

За допомогою торцевих ущільнень вдається практично повністю запобігти витоку середовища або потрапляння повітря в порожнину апарату в місці виведення вала. Тривалість безвідмовної роботи торцевого ущільнення щонайменше 2000 год при ресурсі роботи 8000 год. Допустиме радіальне биття вала в зоні торцевого ущільнення не більше 0,25 мм, кутове биття вала не більше 0,25 °С [77].

Барботажні ферментатори представляють собою апарати, в яких масообмінні процеси між газом і рідиною протікають під час проходження газу у вигляді газових бульбашок (дискретна фаза) через шар рідини або суспензії (суцільна фаза). При цьому цільовим компонентом перенесення є кисень, що міститься в повітрі.

Широке застосування барботажних ферментерів обумовлено рядом переваг в порівнянні з іншими конструкціями апаратів:

- простота конструкції;
- надійність в експлуатації;
- висока теплова стійкість;
- висока надійність проведення процесів;
- відсутність в реакційному просторі рухомих частин;
- можливість розміщення вбудованих елементів (теплообмінників, піногасників БИОТЕХНО (Білорусь) і ін.). [77].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

3.1.5. Характеристика ферментера.

Ферментери за способом культивування поділяються на апарати безперервної та періодичної дії, за стерильністю на герметичні та негерметичні; за конструктивними ознаками з дифузором та турбіною, з аератором, що обертається, з механічними мішалками, колонні з ежекцією повітря [78].

Найбільш універсальна, що часто застосовується на практиці, класифікація ферментерів за способом підводу енергії до апарата: з підведенням енергії газовою фазою, рідкою фазою, комбіновані. Для кожної з них можуть бути однакові методики інженерних розрахунків. Кожні з трьох видів ферментерів, в свою чергу, поділяють:

- 1) на барабанні, барботажно-аерліфтні, колонні;
- 2) ежекційні з турбінною мішалкою, з зовнішнім циркуляційним контуром;
- 3) барабанні з механічним перемішувачем.

Ферментер з підводом енергії газовою фазою характеризується перш за все простою конструкцією, високою експлуатаційною надійністю у зв'язку з відсутністю вузлів та деталей, що рухаються. [78].

У мікробіологічній промисловості практично всі процеси культивування продуцентів біологічно активних речовин, за винятком дріжджів для одержання білково-вітамінних концентратів на парафінних гідролізатах та сульфідних розчинах, здійснюються періодичним способом у стерильних умовах [79].

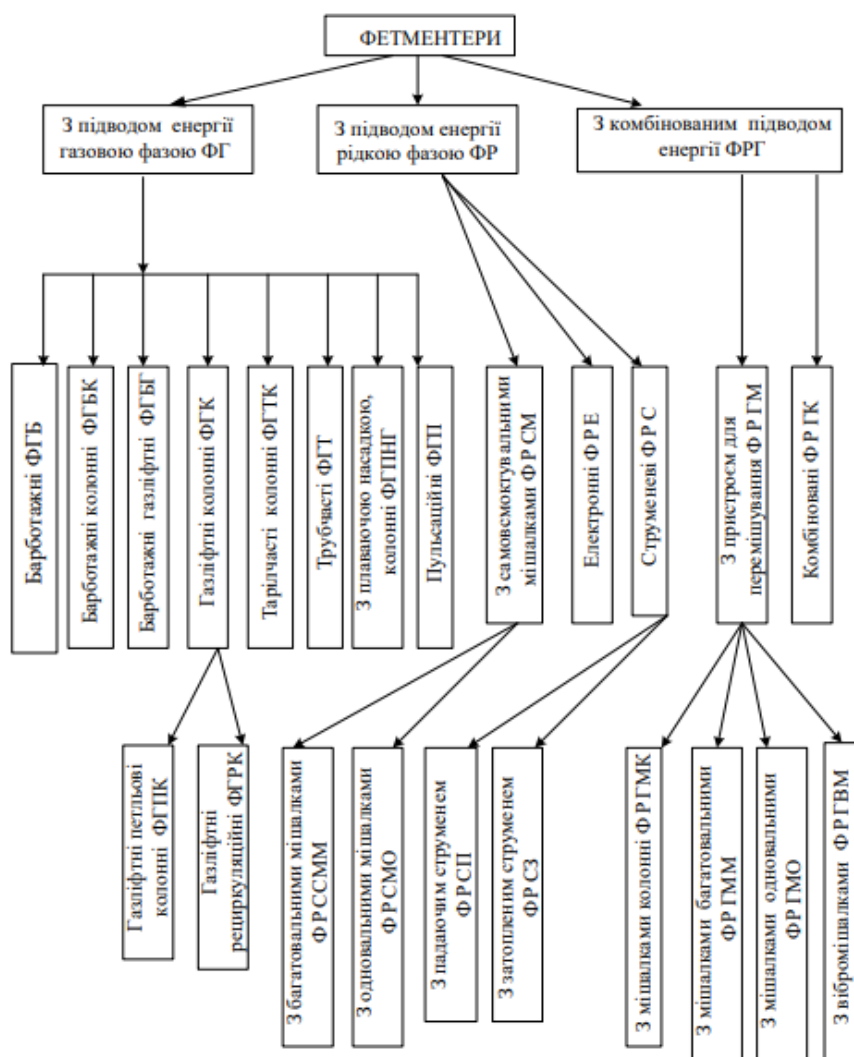


Рисунок 3.2. Схема класифікації ферментерів за способом підводу енергії.

Ферментери з підводом енергії газовою фазою.

Загальною ознакою цих апаратів є введення енергії газовою фазою, яка є її носієм і за рахунок якої здійснюється процес перемішування. Ця група ферментерів характеризується, перш за все, простотою конструктивного виконання і високою експлуатаційною надійністю в зв'язку з відсутністю рухомих вузлів і деталей. У найпростішому вигляді такий ферментер є посудиною в яку через барботер підводиться повітря або спеціальна газова суміш. Бульбашки, що виходять з барботера здійснюють процеси аерації, перемішування і термостатування в культуральній рідині. Для поліпшення

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

процесів масо-і теплообміну використовують різні конструктивні рішення, спрямовані перш за все на більш рівномірний і швидкий розподіл бульбашок повітря по всьому об'єму апарату. Серед конструкцій таких ферментерів найбільш поширені барботажні, барботажно-газліфтні, тарілчасті колонні, насадкові колонні і ряд інших. Підведення або відведення (за потребою) тепла в таких апаратах здійснюється вбудованими всередині апарату теплообмінниками Техно-СТ (Україна) різної конструкції [79].



Рисунок 3.3. Ферментери з пневматичним перемішуванням:

а) ерліфтний;

б) бульбашкового типу.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

Ферментери з підведенням енергії рідкої фазию.

Зазвичай енергія в апаратах цієї групи передається рідкій фазі за допомогою насоса Watson-Marlow (United Kingdom). При цьому рідина подається в ферментер через спеціальний пристрій (сопло, ежектор, диспергатор і т.д.). Розрізняють в загальному випадку три типи конструкцій таких апаратів:

- а) ферментери ежекційні (ФЖЕ);
- б) ферментери струменеві (ФЖС);
- в) ферментери з самовсмоктуючий мішалками (ФЖСМ);

У ферментерах ежекційного типу, що працюють в режимі рециркуляції, культуральна рідина що подається в ферментер проходить під тиском через спеціальний пристрій так званий ежектор Pedrollo JSW (Італія), в якому відбувається її інтенсивне перемішування з повітрям і насичення киснем. Далі утворюється газо-повітряний струмінь, що під великим тиском вводиться в ферментер з боку, перемішуючи вміст і розподіляючи бульбашки повітря по всьому об'єму апарату. Недоліком апаратів є необхідність застосування спеціальних насосів для перекачування газовмістних культуральних рідин. [79].

Струменеві ферментери конструктивно поділяються на два типи: з "затопленою" і "падаючою" струменем. У першому випадку струмінь газорідинної суміші вводиться в культуральну рідину зверху через занурену в неї трубу, в другому - подається в неї під тиском з певної висоти. Утворення газорідинної суміші, як і в разі ежекційних ферментерів, здійснюється за допомогою ежектора, що знаходиться в зовнішньому циркуляційному контурі. Недоліки струменевих ферментерів аналогічні недолікам ежекційних. На відміну від ежекційних і струменевих, ферментери з самовсмоктуючою мішалкою є досить простими апаратами, так як не вимагають спеціальних

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

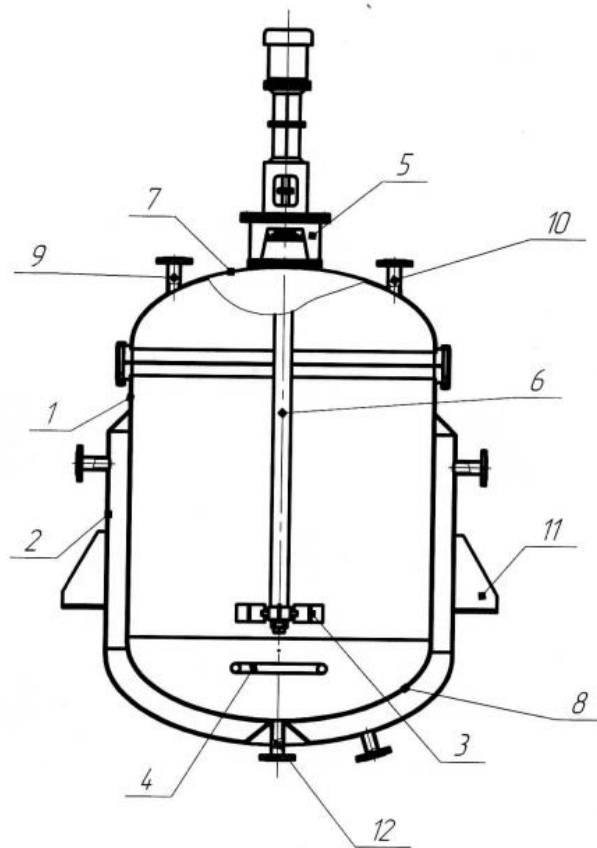
повітродувних машин для подачі повітря в апарат. Надходження повітря здійснюється за рахунок простору, що виникає за задньою кромкою лопаті мішалки при її русі в рідині. В лопатях такої мішалки повітряні канали, які через порожнистий вал з'єднуються з повітропроводом Vents Spirovent (Україна). До недоліків цієї схеми можна віднести труднощі оптимізації та управління всією сукупністю масообмінних і гідродинамічних процесів в такому ферментері [79].

Ферментери з підведенням енергії рідкої і газовими фазами.

Основним конструктивним елементом таких апаратів є пристрій, що забезпечує високу інтенсивність розчинення кисню і високий ступінь диспергування газу, нерозчинних субстратів і гомогенізації середовища. До цієї групи апаратів відносяться такі ферментери, у яких енергія до рідкої фази підводиться одночасно пристроєм, і насосом Watson-Marlow (United Kingdom) або тільки насосом [80]. Енергія з газової фази при цьому вводиться звичайним способом (через барботер). Відповідно розрізняють і два типи таких апаратів:

а) Ферментери із пристроями (ФЖГМ).

Перемішувачий пристрій таких ферментерів зроблений у вигляді валу з встановленими на ньому однією або декількома мішалками. Під нижньою мішалкою у днища зазвичай розташований газорозподільник (барботер), який може бути як рухомих, так і нерухомих. Усередині апарату розміщуються теплообмінники [80].



*Рисунок 3.4. Ферментер з механічним перемішуючим пристроєм і барботером:
1 – корпус, 2 – сорочка; 3 – мішалка; 4 – барботер; 5 – двигун з приводом; 6 – вал мішалки; 7 – кришка; 8 – днище; 9,10 – штуцери; 11 – опора; 12 – штуцер для зливу продукту.*

б) Ферментери комбіновані (ФЖКХ).

В апаратах такого типу перемішування здійснюється насосом або одночасно мішалкою і насосом. Повітря в апарат при цьому подається через барботер [81].

Висновки до розділу

Отже, був обраний спосіб глибинного культивування, цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментерів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Також з переваг можна виділити: простоту обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини. Для культивування запропонований ферментер з механічним перемішуванням, оскільки він має ряд переваг, такі як висока швидкість масопередачі кисню і значна економія потужності.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Опис технологічного процесу

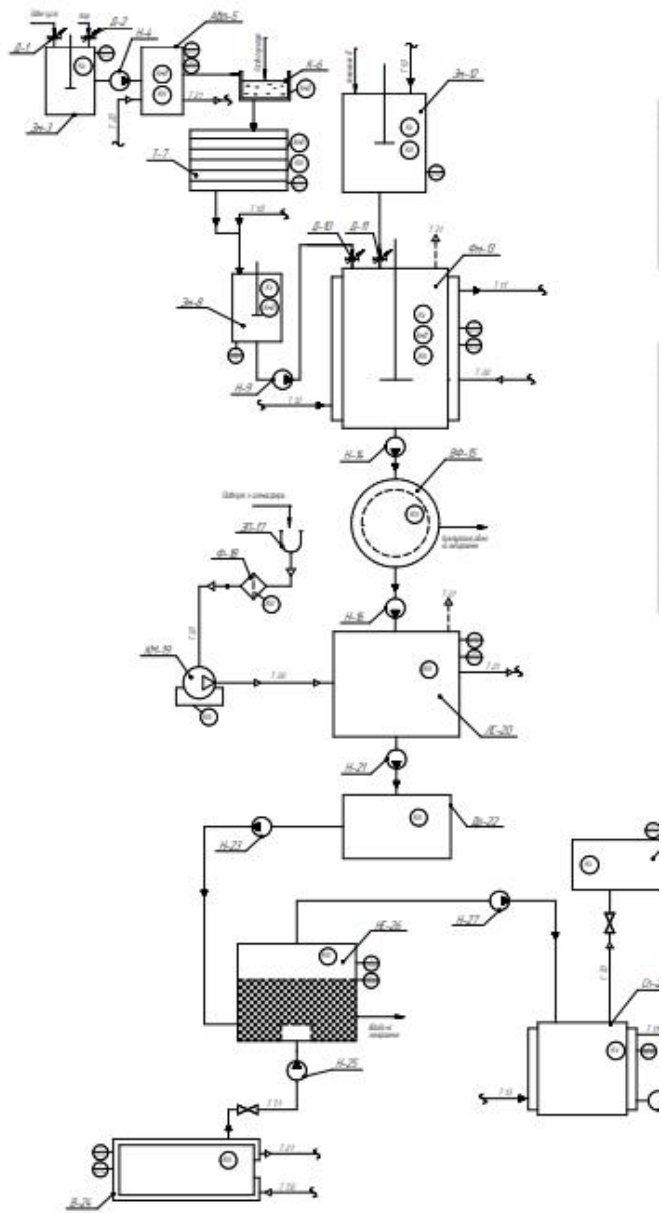


Рисунок 4.1. Апаратурна схема отримання ліпідів мукових грибів:

Зм-1, Зм-5, Зм-6 – змішувач; А-2 – автоклав; К-3 – кювета; Т-4 – термостат;
Фм-7 – ферментер; ВМ-8 – вакуум-фільтр; Пз-9 – забирач повітря; Ф-10 –
повітряний фільтр; КМ-11 – компресор; ЛС-12 – ліофільна сушарка; Др-13 –
дробарка; В-14 – випарник; Н-15 – насос; НЕ-16 – надкритичний екстрактор;
Сп-17 – сепаратор; Зб-18 – збирач CO₂;

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Шмиговськи				Розділ 4 Технологічна частина	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.	Левтун І.І.							
							76	124
Керів.	Левтун І.І.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

Далі надається поетапний опис технології отримання ліпідів мукових грибів.

ДР 1. Підготовка очищеного повітря.

ДР 1.1. Підготовка повітря для аерації.

Для забезпечення інтенсивного перемішування застосовують барботажні системи, барботажне повітря яке подається до ферментера повинно бути очищеним від домішок. Проводиться технічний контроль обладнання.

ДР 1.2. Забір повітря з атмосфери.

Здійснюється за допомогою збирача Пз-9 компанії Юнісол (Україна) з висоти 4 м. Проводиться технічний контроль обладнання на справність.

ДР 1.3. Очищення у повітряному фільтрі.

Використовується повітряний фільтр Ф-10 виду ФПГ (Україна), ефективність очищення - 80% (ДСТУ 3186-95), з діаметром порів в 2 мкм, що дозволяє затримати механічні домішки, пил та ін. Проводиться технічний контроль фільтруючого матеріалу та фільтру на наявність пошкоджень.

ДР 2. Приготування сусло-агару.

ДР 2.1 Приготування сусло-агару.

Проводиться змішування компонентів у змішувачі Зм-1, яке забезпечується турбінними мішалками VMP-680, у співвідношенні 20 г агару на 1 л пивного сусла. Проводиться технічний контроль обладнання та хімічний контроль суміші.

					<i>ЕКБ.БЕ6122.ДП</i>	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ДР 2.2 Стерилізація сусло-агару.

Готову суміш стерилізують у автоклаві А-2 "A100 electro" (Україна) за температури 112 °С протягом 15 хв. Проводиться хімічний контроль рівня рН = 6,5-7, технічний контроль обладнання та контроль процесу стерилізації.

ДР 3. Підготовка поживного середовища.

У змішувачі Зм-6 відбувається змішування за допомогою турбінних мішалок серії VMP-680 (Україна). Потужність мішалки - 1 кВт, частота обертів - 680 об/хв. Змішувачі обладнані шнековими дозаторами ДШ2-1.

Компоненти поживного середовища у заданих пропорціях %: глюкоза - 5, нітрат амонію - 0,12, сульфат магнію семиводний - 0,025, дигідрофосфат калію - 0,1, дріжджовий екстракт - 0,1. Проводиться технічний контроль обладнання та контроль хімічного складу середовища.

ДР 4. Підготовка посівного матеріалу.

ДР 4.1. Висівання спор мукових грибів на сусло агар.

Висівання спор продуцента проводиться поверхнево у кюветах К-3 на сугло-агарі. Проводиться мікробіологічний контроль культури.

ДР 4.2. Культивування спор.

Кювети з культурою поміщаються у термостат Т-4 "ТС-320" (Україна) де культивуються протягом 5 діб за температури 27-28°С. Проводиться технічний контроль обладнання та параметрів культивування.

ДР 4.3. Змив спор водою з поверхні сусло-агару.

Проводиться контроль обладнання та стану культури продуцента.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ДР 5. Підготовка інокуляту.

Після змиву спор з поверхні агару стерильною водою, інокулят потрапляє до змішувача Зм-5, де витримується 20-30 хв при слабкому перемішуванні. Проводиться технічний контроль обладнання та концентрацій клітин у інокуляті.

ТП 6. Культивування мукорових грибів.

Культивування продуценту відбувається партійним способом. У ферментер Фм-7 надходить поживне середовище та підготований інокулят. Культивування проходить за температури $29 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ протягом 96-120 годин. рН середовища підтримується у межах 6,5-7. Температура культивування забезпечується за рахунок надходження у сорочку ферментера теплового агенту у вигляді підігрітої води до температури 30°C . Перемішування вмісту апарату відбувається за допомогою лопатевої мішалки та барботуванням середовища повітрям. Проводиться технічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 7. Відділення біомаси від поживного середовища шляхом фільтрації.

Розділення міцелію та культуральної рідини відбувається у барабанному вакуумфільтрі ВФ-8 УКР-КОНТАКТ. Відпрацьоване середовище направляється на знезараження та утилізацію. Проводиться технічний контроль обладнання та забрудненість мембран.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ТП 8. Ліофільне висушування вологої біомаси.

ТП 8.1 Заморожування.

Перший етап ліофільного висушування в ліофільній сушарці ЛС-12 LYOFLEX (Україна) проходить за температури -40°C , атмосферному тиску протягом 3 годин. Відбувається глибинне заморожування води, що знаходиться у міцелію. Проводиться технічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 8.2 Первинне висушування.

Другий етап ліофільного висушування протікає за температури -5°C та тиску 100 мБар протягом 12 годин. При наднизькому тиску кристалізована вода, що містилася у міцелію з твердого стану одразу переходить у газоподібний. Водяна пара відводиться з апарату. Проводиться технологічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 8.3 Вторинне висушування.

Третій етап ліофільного висушування протікає за температури 30°C у вакуумі протягом 8 годин. На цій стадії випаровується залишкова волога і відводиться у вигляді водяної пари. Проводиться технологічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 9. Подрібнення сухого міцелію.

Подрібнення міцелію відбувається у дробарці Др-13 Артмаш (Україна). Проводиться технічний контроль обладнання.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ТП 10. Екстракція ліпідів з біомаси надкритичним CO₂.

ТП 10.1 Продавлювання міцелію флюїдним CO₂.

У випарник В-14 надходить зріджений CO₂ та, нагріваючись до температури 100°C під дією пари у сорочці апарату, за допомогою насосу Н-15 під тиском в 50 МПа подається у надкритичний екстрактор HE-16 TORTION (Shaanxi, China) зі швидкістю потоку 12 мл/год. У надкритичному екстракторі HE-16 флюїдний CO₂ продавлюється через касету з завантаженим подрібненим міцелієм. Проводиться контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 10.2 Розділення CO₂-екстракту шляхом охолодження.

Отриманий внаслідок продавлювання CO₂-екстракт подається у сепаратор MAXCLEAN Сп-17, де, під дією води для охолодження в сорочці апарату, за нормальних умов охолоджується до температури 25°C. CO₂-екстракт розділяється на суміш ліпідів і газоподібний CO₂, що накопичується у збирачі Зб-18. Ліпідна суміш надходить у реактор Р-19. Проводиться контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ПВ 11. Переробка відходів.

На дану стадію поступає біомаса, що має здатність до використання чи переробки, збирається фільтрувальний матеріал для повторного використання біомаси.

ЗВ 12. Знешкодження відходів.

На дану стадію поступають продукти, що не можуть більше використовуватись, виснажену і промиту біомасу зливають в каналізацію.

					<i>ЕКБ.БЕ6122.ДП</i>	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

4.2 Розрахунок виробничої потужності.

Згідно з досить новою технологією отримання ліпідів з мукорових грибів, а саме культивування *Cunninghamella japonica*, пропонується проект виробництва ліпідів в обсязі 2,5 т/добу, що на рік становить 837,5 т/рік, при безперервному режимі роботи підприємства.

Тривалість виготовлення партії, виходячи з найдовшої стадії виробництва, а саме культивування мукорового гриба *Cunninghamella japonica* у ферментері, становить 4 доби. При безперервному режимі роботи підприємства, враховуючи 30 днів на зупинки, ремонти, очищення обладнання і т.д. та партійність виробництва, проектна продуктивність праці підприємства:

$$Q_{\text{Пр}} = \frac{V}{T} \cdot t = \frac{837,5}{335} \cdot 4 = 10 \text{ т/партію} \quad (4.2.1),$$

За 1 день – 2,5 тонн

де $Q_{\text{Пр}}$ – проектна продуктивність праці підприємства, V – загальна запланована потужність підприємства на рік, T – тривалість календарного року;
 t – час культивування

Для ферментерів номінальним об'ємом 50 м³, що використовуються на виробництві при обраному режимі роботи партійна продуктивність складає 0,6 м³ (600 літрів) культуральної рідини на партію

За запропонованою технологією культивування вміст ліпідів складає 42,4%.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Тому кількість біомаси, яку необхідно наростити складає:

$$m_{\text{бм}} = \frac{m_{\text{ліп}}}{w_{\text{бм} \rightarrow \text{ліп}}} = 2,5 / 0,424 = 5,9 \text{ т} \quad (4.2.2),$$

де $m_{\text{бм}}$ – суха біомаса грибів, кг; $m_{\text{ліп}}$ – маса ліпідів, яку необхідно одержати, кг; $w_{\text{бм} \rightarrow \text{ліп}}$ – вміст ліпідів у біомасі *Cunninghamella japonica*.

Загальний об'єм виробництва складає:

$$V_{\text{заг}} = m_{\text{бм}} / C_{\text{бм}} = 5,9 / 0,01916 = 307,9 \text{ м}^3 \quad (4.2.3),$$

Об'єм кришки і днища складає 30% об'єму реактора, їх об'ємом можна знехтувати оскільки 30% відповідає вимогам до коефіцієнта заповнення.

Кількість реакторів для виробництва 2,5 т/добу ліпідів складатиме

Для перемішування культурального середовища в реакторі встановлено лопатеві мішалки зі швидкість перемішування 1 об/с та барботуванням середовища повітрям

4.3. Визначення конструктивних параметрів апарата.

Розрахунок проводимо згідно методики в літературі [82].

Розрахункова схема представлена на рисунку 4.2.

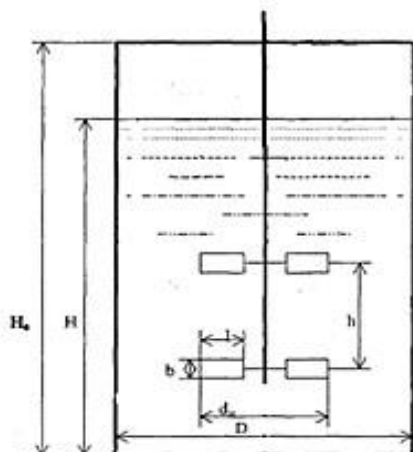


Рисунок 4.2. Схема ферментера з перемішувальним пристроєм.

Метою розрахунку є визначення основних розмірів ферментера, лопатевої мішалки та барботера.

Вихідні дані:

Частота обертів мішалки n , об/хв	60;
Об'єм суміші в апараті V_p , м ³	32,5;
Коефіцієнт заповнення φ	0,65;
Температура культурального середовища $T_{кр}$, К (°С)	302(29);
Густина культурального середовища ρ_p , кг/м ³	1007,1;

За ГОСТ 20680-2002 для ферментеру з номінальним об'ємом $V_n = 50 \text{ м}^3$ з кількох можливих діаметрів обираємо $D = 3 \text{ м}$.

Найчастіше в промисловості використовують турбінну шестилопатеву мішалку.

Розрахуємо робочий об'єм апарату:

$$V_p = V_{\text{заг}} \cdot K_3 = 50 \cdot 0,65 = 32,5 \text{ м}^3 \quad (4.3.1),$$

де K_3 – коефіцієнт заповнення.

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533-78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

$h_1 = 0,1 \text{ м}$ – висота основи еліптичного днища;

$s = 0,012 \text{ м}$ – товщина стінки еліптичного днища;

$V_{\text{дн}} = 4,229 \text{ м}^3$ – об'єм еліптичного днища.

$F = 10,70 \text{ м}^2$, - площа еліптичного днища.

Для даного апарату обрано товщину стінки $s = 12 \text{ мм}$.

Повний об'єм ферментера V_n розраховуємо за формулою:

$$V_n = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}},$$

звідки знаходимо об'єм циліндричної частини апарату:

$$V_{\text{ц}} = V_n - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 50 - 2 \cdot 4,229 = 41,542 \text{ м}^3 \quad (4.3.2),$$

Висота циліндра:

$$H_y = \frac{4 \cdot V_y}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 41,542}{3,14 \cdot 3^2} = 5,879 \quad (4.3.3),$$

$$H_{up} = \frac{4 \cdot (V_p - V_{on})}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot (32,5 - 4,229)}{3,14 \cdot 3^2} = 4,001 \text{ м} \quad (4.3.4),$$

$$H_p = 4,001 + 0,85 = 4,85 \text{ м} \quad (4.3.5),$$

Визначаємо висоту циліндричної обичайки апарата:

$$H_{\text{цил.об}} = \frac{4 \cdot V_{an}}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 50}{3,14 \cdot 3^2} = 7 \text{ м} \quad (4.3.6),$$

Висоту циліндричної обичайки приймаємо 7 м.

Площа поверхні циліндричної обичайки апарата:

$$F_{\text{ап}} = \pi \cdot D \cdot H_{\text{цил.об}} = 3,14 \cdot 3 \cdot 7 = 66 \text{ м}^2 \quad (4.3.7),$$

Приймаємо стандартний внутрішній діаметр апарату $D = 3$ м і висоту циліндричної обичайки апарата $H = 7$ м, з площею поверхні $F = 66 \text{ м}^2$.

4.4. Розрахунок геометричних розмірів мішалки.

Розрахунок проводимо згідно методики в літературі [82].

Діаметр мішалки:

$$d_{\text{м}} = \frac{D}{3} = \frac{3}{3} = 1 \text{ м} \quad (4.4.1),$$

Висота лопаті:

$$b_{\text{л}} = 0,2 \cdot d_{\text{м}} = 0,2 \cdot 1 = 0,2 \text{ м} \quad (4.4.2),$$

Довжина лопаті:

$$l_{\text{л}} = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 0,25 \cdot 1 = 0,25 \text{ м} \quad (4.4.3),$$

Кількість ярусів:

$$m_{\text{я}} = \frac{D}{d_{\text{м}} \cdot 1,5} = \frac{3}{1 \cdot 1,5} = 2 \quad (4.4.4),$$

Приймаємо турбінну мішалку з діаметром 1 м, висотою лопаті 0,2 м, довжиною лопаті 0,25 м. Мішалки розташовуємо в 2 яруси

4.5 Розрахунок геометричних розмірів барботера

Розрахунок проводимо згідно методики в літературі [82].

Схема барботера показана на рисунку 4.3.

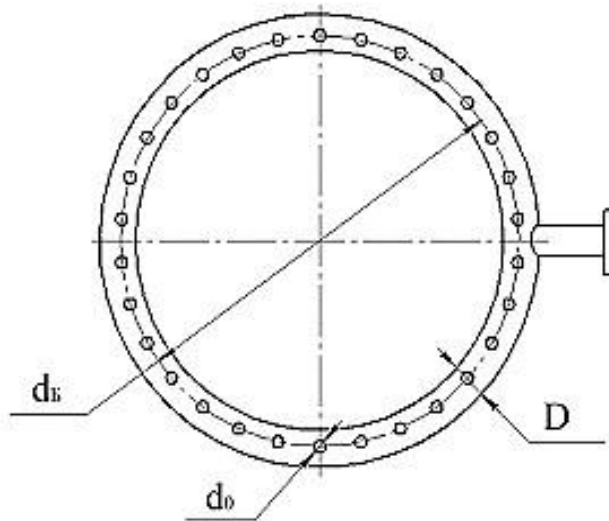


Рисунок 4.3. Схема барботера.

Для аерування $32,5 \text{ м}^3$ біомаси потрібно витратити повітря:

$$L_{\text{аер.пов.}} = 0,017 \cdot V = 0,017 \cdot 32,5 = 0,5525 \text{ м}^3/\text{с} \quad (4.5.1),$$

Приймаємо, що швидкість виходу повітря з отворів барботеру становить 20 м/с . Тоді площа усіх отворів барботера повинна становити:

$$\sum F_{\text{отв}} = \frac{V_{\text{нов}}}{W_{\text{нов}}} = 0,028 \text{ м}^2 \quad (4.5.2),$$

Приймаємо, що діаметр одного отвору становить 5 мм з відповідною площею $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ м}^2$.

Визначаємо кількість отворів:

$$n_{отв} = \frac{\sum F_{отв}}{F_{отв}} = \frac{0,028}{1,96 \cdot 10^{-5}} = 1428 шт \quad (4.5.3),$$

Середній діаметр кільця барботера дорівнює діаметру мішалки:

$$d_{барб} = d_m = 1 \text{ м}$$

Довжина кола на якому повинні бути розташовані отвори:

$$l_{кола} = d_{барб} \cdot 3,14 = 1 \cdot 3,14 = 3,14 \text{ м} \quad (4.5.4),$$

Відстань між сусідніми отворами:

$$x = \frac{l_{кола}}{n_{отв}} = \frac{3,14}{1428} = 0,0022 \text{ м} \quad (4.5.5),$$

Це менше ніж рекомендована відстань $t=25-30$ мм. Для досягнення рекомендованої відстані можна розташувати отвори в два ряди.

Кількість отворів в одному ряді:

$$N_{отв} = \frac{l_{кола}}{t} = \frac{3140}{25} = 126 \text{ шт} \quad (4.5.6),$$

Кількість рядів:

$$n_{ряд} = \frac{n_{отв}}{N_{отв}} = \frac{1428}{126} = 11 \text{ шт} \quad (4.5.7),$$

Допускається не створювати окремий ряд отворів, що не перевищує 10%<7% отворів ряду – це не викличе суттєвих змін.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						89
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Визначаємо діаметр труби барботера:

$$D_{\text{барб}} = 11 \cdot x = 11 \cdot 25 = 275 \text{ мм} \quad (4.5.8),$$

де x – рекомендована відстань між рядами отворів, $x = 25$ мм (рисунок 4.4).

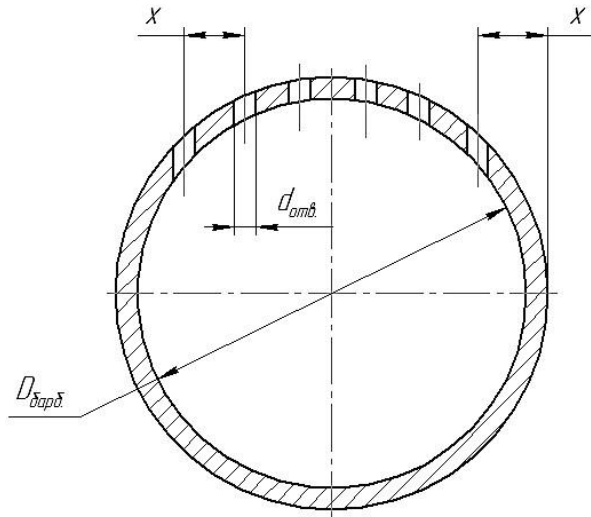


Рисунок 4.4. Схема розташування рядів отворів в трубі барботера.

Дійсна швидкість повітря в барботері:

$$W_{\text{пов}} = \frac{L_{\text{аер.пов}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{барб}}^2} = \frac{0,5525 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,275^2} = 9,3 \text{ м/с} \quad (4.5.8),$$

В результаті розрахунку було прийнято: середній діаметр кільця барботера – 1 м, кількість отворів 1428, розташованих в два ряди, і внутрішній діаметр труби барботера – 275 мм

4.6 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Мета розрахунку – знайти мінімальну потужність приводу мішалки, та порівняти її з потужністю даного приводу.

Вихідні данні:

Робочий об'єм ферментера V_p , м³ 32,5;

Густина повітря $\rho_{пов}$, кг/м³ 1,9;

Діаметр лопатевої мішалки d_m , м 1;

Число ярусів мішалки m_j , шт. 2;

Внутрішній діаметр апарата D , м 3;

Висота рідини у ферментері h , м 4,85;

Частота обертання вала мішалки n , с⁻¹ 1;

Витрати барботуючого газу $L_{аер.пов}$, м³/с 0,5525;

Густина середовища ρ_p , м³/кг 1007,1.

Розрахунок проводимо згідно методики в літературі [71].

Відцентровий критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{1 \cdot 1^2 \cdot 1007,1}{0,9744 \cdot 10^{-3}} = 1033,5 \cdot 10^{-3} \quad (4.6.1),$$

де $\mu_p = 0,9744 \cdot 10^{-3}$ Па·с; ρ_p – густина культуральної рідини при $T = 302$ К,
 $\rho_p = 1007,1$ м³/кг.

За довідковою літературою знаходимо коефіцієнт потужності мішалки k_n
 $= 4$.

Потужність, що витрачається на перемішування гомогенної рідини:

$$N_p = k_n \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 4 \cdot 1007,1 \cdot 1^3 \cdot 1^5 = 4028,4 \quad (4.6.2),$$

Потужність, що витрачається на перемішування газорідинної суміші:

$$N_{гр} = N_p \cdot (1 - 1,26 \cdot k_1) = 4028,4 \cdot (1 - 1,26 \cdot 0,5525) = 1224 \text{ Вт} \quad (4.6.3),$$

де k_1 – критерій витрати газу:

$$k_1 = \frac{L_{\text{аер.пов}}}{n \cdot d_M^3} = \frac{0,5525}{1 \cdot 1^3} = 0,5525 \quad (4.6.4),$$

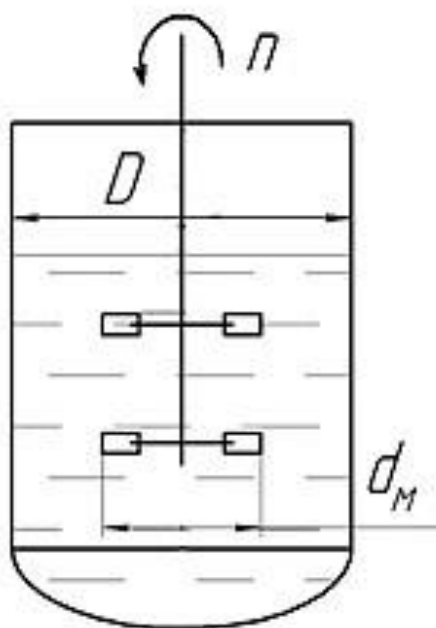


Рисунок 4.5. Розрахункова схема.

При встановленні $m_{\text{я}}$ мішалок на валу потужність, що витрачається на перемішування:

$$N_{\text{м}} = N_{\text{гр}} \cdot (1 + 1 \cdot m_{\text{я}}) = 1224 \cdot (1 + 1 \cdot 2) = 3672 \text{ Вт} \quad (4.6.5),$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

$$N = k_1 \cdot k_2 \cdot N_{\text{м}} = 1,1 \cdot 1,9 \cdot 3672 = 7674,5 \text{ Вт} \quad (4.6.6),$$

де $k_1 = 1,1$ – коефіцієнт, що враховує збільшення потужності за рахунок збільшення кількості біомаси; k_2 – коефіцієнт, що враховує наявність перегородок та труби для передавлювання середовища:

$$k_2 = \sqrt{\frac{H_{\text{р}}}{D}} = \sqrt{\frac{5,642}{3}} = 1,9 \quad (4.6.7),$$

де $H_{\text{р}}$ – висота рідини в ферментері в робочих умовах (через наявність газу в рідині буде більшою ніж початкова):

$$H_p = \frac{\left(\frac{a \cdot V_p \cdot d_6}{6} + V_p\right) \cdot 4}{\pi \cdot D^2} = 5,642 \text{ м} \quad (4.6.8),$$

де а – газовміст системи (розраховується в п. 5.4), а = 71,525 м²/м³; d₆ – середній діаметр газових бульбашок (розраховується в п. 5.4), d₆=0,019 м.

Мінімальна потужність електродвигуна приводу:

$$N_{\text{пр}} = \frac{N}{\eta} = \frac{7674,5}{0,9} = 8527,2 \text{ Вт} \quad (4.6.9),$$

де η – К.К.Д. приводу мішалки η = 0,9.

Приймаємо потужність електродвигуна 9 кВт.

Потужність електродвигуна достатня для того, щоб забезпечити перемішування культуральної рідини турбінною мішалкою діаметром 1 м³ частотою обертання вала 1 с⁻¹.

4.7 Розрахунок коефіцієнта масопереносу при механічному диспергуванні газу в рідині

Мета розрахунку – знайти коефіцієнт масовіддачі та потік маси O_2 від газової фази до культуральної рідини, який забезпечується при даному режимі перемішування та витраті барботуючого газу.

Вихідні дані:

Робочий об'єм ферментера V_p , m^3	32,5;
Діаметр відкритої турбінної мішалки d_m , м	1;
Густина повітря при $T = 293\text{ K}$ ρ_r , kg/m^3	1,2;
Число ярусів мішалки m_j , шт.	2;
Внутрішній діаметр апарата D , м	3;
Висота рідини в ферментері h , м	4,85;
Частота обертання вала мішалки n , s^{-1}	1;
Витрати барботуючого газу q , m^3/s	0,5525;
Густина середовища ρ_p , kg/m^3	1007,1;
Динамічна в'язкість рідини μ_r , $Pa \cdot s$	$0,9744 \cdot 10^{-3}$;
Коефіцієнт фазової рівноваги, при 302 K m , Па	$4,18 \cdot 10^9$;
Середня концентрація кисню в повітрі y , kg/m^3	0,17;
Тиск надрідиною в ферментері p , МПа	0,1.

Розрахунок проводимо згідно методики у літературі [72].

Схема процесу переносу кисню в ферментері зображена на рисунку 4.6.

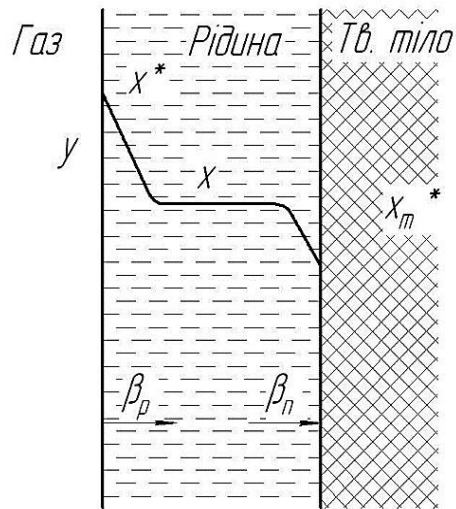


Рисунок 4.6. Схема процесу переносу кисню в ферментаторі.

Дисипація енергії, що вводиться в об'єм рідини перемішуючим пристроєм:

$$\varepsilon_m = \frac{N_{гр}}{V_p} = \frac{1224}{32,6} = 37,7 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^3} \quad (4.7.1),$$

Приведена швидкість в апараті:

$$W_r = \frac{q}{0,785 \cdot D^2} = \frac{0,5525}{0,785 \cdot 1^2} = 0,7 \frac{\text{м}}{\text{с}} \quad (4.7.2),$$

Дисипація енергії при барботажі газу крізь рідину:

$$\varepsilon_r = \rho_p \cdot g \cdot W_r = 1007,1 \cdot 9,81 \cdot 0,7 = 6915,8 \text{ Вт/м}^3 \quad (4.7.3),$$

Швидкість спливання газових бульбашок:

$$U_{\Pi} = 1,5[\sigma \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_r)/\rho_p^2]^2 = 1,5[0,05 \cdot 9,81 \cdot (1007,1 - 1,2)/1007,12]^2 = 0,2228 \text{ м/с} \quad (4.7.4),$$

де g – поверхневий натяг рідини при $T = 302 \text{ К}$, $\sigma = 0,05 \text{ Н/м}$.

Газовміст системи:

$$\varphi_r = \frac{W_r}{c \cdot (W_r + W_p) + k U_{\Pi}} = \frac{0,7}{1 \cdot 0,7 + 1 \cdot 0,2228} = 0,758 \quad (4.7.5),$$

де коефіцієнти пропорційності $C=1$ та $k=1$, а швидкість рідини $W_p=0$.

Середній діаметр газових бульбашок:

$$d_{\delta} = 4,14 \cdot \left[\frac{\sigma^3 \cdot g}{\rho_p \cdot \varepsilon_M^2} \right]^{0,2} \cdot \varphi^{0,5} = 0,028 \text{ м} \quad (4.7.6),$$

Питома площа міжфазної поверхні:

$$a_1 = \frac{6 \cdot \varphi_r}{d_{\delta}} = \frac{6 \cdot 0,758}{0,028} = 162,4 \frac{\text{м}^2}{\text{м}^3} \quad (4.7.8),$$

або

$$a_2 = 1,44 \left(\frac{\varepsilon_M^{0,4} \cdot \rho_p^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \right) \left(\frac{W_r}{U_{\Pi}} \right)^{0,5} = 262,25 \frac{\text{м}^2}{\text{м}^3} \quad (4.7.9),$$

Серед двох значень приймаємо середнє:

$$a = \frac{a_1 + a_2}{2} = \frac{162,4 + 262,25}{2} = 212,325 \frac{\text{м}^2}{\text{м}^3} \quad (4.7.10),$$

Об'ємний коефіцієнт масовіддачі при встановленні та відкритих турбінних мішалок на валу:

$$\beta_p a = 0,8 \cdot \varepsilon_{\Pi}^{0,5} \cdot n^{0,2} \cdot m_{\text{я}}^{0,47} \cdot \left(\frac{d_m}{D}\right)^{0,18} == 0,8 \cdot 6953,5^{0,5} \cdot 1^{0,2} \cdot 2^{0,47} \cdot \left(\frac{1}{3}\right)^{0,18} = 75,82 \text{ с}^{-1} \quad (4.7.11),$$

де ε_{Π} – сумарна дисипація енергії, що вводиться в об'єм рідини перемішуванням та при барботуванні газу крізь рідину:

$$\varepsilon_{\Pi} = \varepsilon_M + \varepsilon_T = 37,7 + 6915,8 = 6953,5 \text{ Вт/м}^3 \quad (4.7.12),$$

Поверхневий коефіцієнт масовіддачі:

$$\beta = \frac{\beta_p a}{a} = \frac{75,82}{212,325} = 0,357 \frac{\text{м}}{\text{с}} \quad (4.7.13),$$

За законом Шукарева потік маси, що забезпечується перемішуванням дорівнює:

$$M_{O_2} = \beta \cdot F \cdot (x^* - x) = 0,357 \cdot 6900,56 \cdot (0,0041 - 0,00082) = 8,08 \text{ кг/с} \quad (4.7.14),$$

F – площа поверхні контакту фаз:

$$F = a \cdot V_p = 212,325 \cdot 32,5 = 6900,56 \text{ м}^2 \quad (4.7.15),$$

x^* – рівноважна концентрація кисню на межі розділу фаз:

$$x^* = \frac{y \cdot p \cdot \rho_p}{m} = \frac{0,17 \cdot 0,1 \cdot 10^6 \cdot 1007,1}{4,18 \cdot 10^9} = 0,0041 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3} \quad (4.7.16),$$

Концентрація кисню розчиненого в об'ємі рідини:

$$x \approx 0,2 \cdot x^* = 0,2 \cdot 0,0041 = 0,82 \cdot 10^{-3} \text{ кг/м}^3 \quad (4.7.17),.$$

Потік маси кисню від повітря до рідини при даному режимі перемішування складає 8,08 кг/с, що задовольняє умови роботи ферментера забезпечуючи перенос до біомаси необхідної кількості кисню.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						99
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

4.8. Матеріальний баланс

Таблиця 4.1. Матеріальний баланс процесу виробництва ліпідів з мукорових грибів.

Використано			Отримано		
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількіс ть	Стадія	Назва кінцевого продукту/напівпродукту, відходів та втрат	Кількіс ть
		кг			кг
Стадія отримання інокуляту	Спори мукорових грибів	24	Стадія отримання інокуляту	Інокулят	268
	Вода	244			
Стадія отримання поживного середовища	Глюкоза	658	Стадія отримання поживного середовища	Поживне середовище	13130
	Нітрат амонію	15,76			
	MgSO4 . 7H2O	3,28			
	KH2PO4	11,32			
	Дріжджовий екстракт	11,32			
	Вода	12431,82			
Стадія культивування мукорових грибів	Поживне середовище	13130	Стадія культивування мукорових грибів	Міцелій продуцента	324
	Інокулят	268		Культуральна рідина	13000
				Втрати	130
Стадія надкритичної екстракції	Сухий міцелій	324	Стадія надкритичної екстракції	Суміш ліпідів	194
				Шлам	130
Всього:		27406,4	Всього:		27406,4

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

За для забезпечення безперервної роботи підприємств в області охорони навколишнього природного середовища та виконання певних заданих нормативів великі підприємства створюють служби для забезпечення екології. На досить не великих виробництвах за це відповідає технолог [83].

Екологічна служба повинна слідкувати за такими вимогами:

-підтримання контролю всіх екологічних правил, вимог, норм та законів охорони навколишнього природного середовища в господарських сферах, створювати плани щодо довготривалих та безпечних умов для охорони середовища, стежити за дотриманням усіх планів щодо охорони середовища.

-оцінювати вплив техніко-екологічних факторів, про розширенню та вдосконаленню вже існуючих структур на навколишнє середовище, створенню нових більш перспективних та удосконалених технологій

-приймати участь у роботах по забезпеченню очищення стічних вод підприємств, зниження кількості викидів в повітря навколишнього середовища, розробка методів повного знешкодження відходів, планів по оптимальному використанню водних та ґрунтових ресурсів [83].

- контроль у технологічних процесів підприємств.

-контролювати стан середовища в області де знаходиться об'єкт (виробництво).

-створення відповідних документів, сертифікатів, вимог, законів до аналітичного контролю середовища.

-контроль технічного стану об'єкта та його придатності до застосування.

-надавати звітність про стан навколишнього середовища та умов виробництва.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шмиговськи			Розділ 5 Охорона праці та довкілля	Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.		Левтун І.І.						
							101	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.								

Підприємство яке дотримується стандартів ISO 14000, екологічна служба допомагає в дотриманні умов, які прописані в стандартах.

Умови при які повинні бути включені:

Відповідно до закону про охорону повітря, підприємства, повинні розробити плани щодо запобігання викидів, які забруднюють повітря. Дозвіл на виробництво та використання технологічного обладнання надається лише за наявності відповідних документів та сертифікатів, а також за умов дотримання всіх стандартів та норм, щодо викиду забруднюючих речовин [83].

Не можна викидати відходи, склад яких не визначений або перевищує норми и можуть негативно вплинути на навколишнє середовище.

Скорочення викидів повинно відбуватися за рахунок спеціальних та технологічних заходів, що знижують поверхневу концентрацію забруднюючих речовин. [83].

Технологічні заходи включають:

- використання більш прогресивних технологій, таких як ті, що застосовуються на інших більш досконалих підприємствах, для отримання тієї ж самої продукції;

- використання у виробництві більш екологічної сировини;

- використання рециркуляції димових газів;

- збільшення одиничної потужності агрегатів з однаковою загальною потужністю;

- впровадження найсучаснішої структури газового балансу в виробництві.

- конкретні заходи щодо зменшення обсягу та токсичності викидів та зниження поверхневих концентрацій забруднюючих речовин включають:

- зменшення витікаючих викидів;

- очищення та нейтралізація шкідливих речовин від відпрацьованих газів;

- поліпшення дисперсії викидів.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Відповідно до закону про охорону атмосферного повітря, викид шкідливих (забруднюючих) речовин у повітря зі стаціонарного джерела дозволений відповідно до спеціального дозволу, що встановлює максимально дозовані викиди та інші умови, що забезпечують захист атмосферного повітря. [83].

За відсутності дозволів на викид шкідливих (забруднюючих) речовин в атмосферу, а також при порушенні умов, передбачених цими дозволами, викиди шкідливих (забруднюючих) речовин в атмосферу повинні бути обмежені або припинені.

Підприємство зобов'язане організувати первинний облік охорони атмосферного повітря. З цією метою проводиться інвентаризація джерел шкідливих викидів. Облік слід проводити регулярно, кожні п'ять років. У разі реконструкції та змін у технології підприємство змінить раніше проведені інвентаризації. Інвентаризація повинна враховувати всі забруднюючі речовини, що потрапляють в атмосферу, які присутні в матеріальному балансі використовуваних технологічних процесів, від усіх стаціонарних організованих та неорганізованих джерел забруднення, наявних на підприємстві та від транспортних засобів. Витрати на виробництво, пов'язані з платежами за інвентаризацію джерел викидів забруднюючих речовин у атмосферу, відносяться до виробничих витрат як частини загальних витрат [83].

Закон "Про захист атмосферного повітря" запроваджує технічні стандарти щодо викидів та гранично допустимих викидів (ГДВ). Технічний стандарт викидів - це стандарт викидів шкідливих (забруднюючих речовин) у повітря, який встановлюється для джерел викидів, технологічних процесів, обладнання та відображає гранично допустиму масу викидів шкідливих (забруднюючих речовин) в атмосферне повітря на одиницю виходу та інших показників.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ГДЧ - норма максимально дозволеного викиду шкідливих (забруднюючих) речовин у повітря. Він повинен визначатися для кожного стаціонарного джерела забруднення повітря з урахуванням технічних норм викидів та забруднення атмосферного повітря за умови, що джерело не перевищує гігієнічні та екологічні стандарти якості повітря, гранично допустимі (критичні) навантаження на екологічні системи та інші екологічні стандарти.

Якщо юридична особа не може дотримуватись МДВ, вони можуть встановити попередньо узгоджені викиди (ПУВ) для цих підприємств спеціально уповноваженими органами з охорони повітря. Тимчасово погоджені викиди встановлюються на період поступового досягнення максимально дозволених викидів відповідно до технічних норм викидів та наявності плану зменшення викидів забруднюючих речовин у атмосферне повітря [84].

Викиди шкідливих речовин у повітря з нерухомого джерела дозволяються на підставі дозволу. Дозвіл на викид шкідливих (забруднюючих) речовин в атмосферне повітря встановлює максимально дозволени викиди та інші умови, що забезпечують захист атмосферного повітря [84].

На персонал впливають такі фактори як: можливість ураження електричним струмом, шум, вміст газових домішок у повітрі, які можуть привести до вибуху та отруєння, біологічне ураження продуктом. Основні фактори:

- 1) виробничий шум і вібрації;
- 2) повітря робочої зони;
- 3) електробезпека;
- 4) пожежна та вибухонебезпека;

Найбільш часті причини аварій посудин, що працюють під тиском, це невідповідність конструкції максимально допустимому тиску і температурі; втрата механічної міцності апарата (корозія, внутрішні дефекти металу, місцеві перегріви); невиконання встановленого режиму роботи; недостатня

кваліфікація обслуговуючого персоналу; відсутність належного технічного нагляду. Вимоги безпеки, що пред'являються до конструкції, виготовлення, та експлуатації посудин, що працюють під тиском, визначені «Правилами будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском» [84].

Рівень шуму та вібрацій. Приміщення, в якому розміщена лінія - закритого типу. Основними джерелами шуму при роботі є електродвигуни, компресори та інше устаткування в яких шум досягає 90 дБА. Згідно норм ДСН 3.3.6.037-99 шум, при роботі, не повинен перевищувати 80 дБА [85]. Заходи та матеріали, що застосовуються задля зниження шуму механічного походження включають: – використання облицювального шумоізоляційного матеріалу з перфоруванням; – звукоізоляція устаткування за допомогою глушників, резонаторів, кожухів, захисних конструкцій, тощо; – звукоізоляція дверного проїому приміщення, покриття стін та підлоги; – своєчасне змащування всіх поверхонь, що труться; – застосування раціональних конструкцій, нових матеріалів і технологічних процесів. Ці заходи дозволяють знизити рівень шуму до прийнятного згідно ДСН 3.3.6.037-99 [85].

Повітря робочої зони. Вентиляційна система має забезпечити виведення пилу з приміщення і доведення якості повітря до встановлених норм. Для індивідуального захисту працівників від летючих подразників застосовують респіратори, протигази, захисні костюми. Аеродинамічні випробування вентиляційних систем проводять не рідше одного разу на рік, а також після кожного капітального ремонту або реконструкції. [86].

Якщо вентиляційна система не забезпечує нормальних умов і чистоти повітря у приміщеннях, то застосовують систему кондиціонування повітря. Необхідно забезпечити захист працівників від елементів устаткування, нагрітих до високих температур і теплового випромінювання яке не повинно перевищувати $q = 350 \text{ Вт/м}^2$. Апарати повинні мати теплоізоляцію з мінеральної вати товщиною від 10 см, що забезпечить прийнятну температуру на поверхні барабана і теплове випромінювання відповідно до ДСН 3.3.6.042-

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						105
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

99 [86]. Перед запуском технологічних апаратів необхідно провести промивку і продувку всіх комунікацій і устаткування, перевірити їх герметичність. Всі насоси, завантажувальні пристрої та інші механізми і машини перевіряють без навантаження і під навантаженням на інертних середовищах. Приміщення обладнанні стендами з зазначеними правилами техніки безпеки, правилами з експлуатації установки, стендами з планом евакуаційних шляхів. Перед початком робіт працівники повинні проходити інструктаж з техніки безпеки [86].

Електробезпека. Приміщення операторної згідно ПУЕ-2017 відноситься до приміщень із підвищеною небезпекою, тому що можливий одночасний дотик людини до з'єднаних під землею технологічних апаратів і металевих корпусів електроустаткування [87].

Основні причини нещасного випадку від впливу електричного струму наступні:

- випадковий дотик або наближення на небезпечну відстань до струмопровідних частин, що перебувають під напругою;
- поява напруги на конструктивних металевих частинах електроустаткування - корпусах, кожухах - у результаті ушкодження ізоляції й інших причин;
- виникнення крокової напруги на поверхні землі в результаті замикання дроту на землю.

Щоб уникнути нещасних випадків застосовується захисне занулення із глухозаземленою нейтраллю. Щоб уникнути ураження від статичної електрики, тому що приміщення категорійне, робиться сітка з металевих пластин перетином 25×4 мм, що розташовується по периметру приміщення, і до якої приєднують мідним дротом $S = 10 \text{ мм}^2$ металеві частини апаратів й устаткування, які перебувають у цьому приміщенні. Для забезпечення безпечної роботи з електроустаткуванням – кабелі та дроти вкладені в труби й заховані під підлогу, рубильники ввімкнення закриті в спеціальні шафи, при роботі з електроінструментами застосовуються індивідуальні засоби захисту [87].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Пожежна безпека. На лінії виробництва ліпідів, яка може в подальшому слугувати для виробництва біодизелю, фармацевтичних препаратів та інших галузях, горючими речовинами є: біодизель, етиловий спирт та мастило, яким змазуються частини конструкції. Пожежні характеристики небезпечних речовин, матеріалів:

Мастило: Температура займання 300°C; температура самозаймання 370°C.

Біодизель: Температура займання 285°C; температура самозаймання 320°C.

Етиловий спирт: Температура займання 13°C; температура самозаймання 404°C.

Біодизель є вибухонебезпечним матеріалом, відноситься до горючих матеріалів, тому технологічний процес утилізації біодизеля відноситься до категорії В (ДСТУ Б В.1.1-36:2016) [77]. Згідно ПУЕ клас зони установки П-Па (зони, розташовані в приміщеннях, в яких зберігаються горючі речовини). Цех в якому знаходиться установка виробництва біодизеля будується з використанням негорючих матеріалів (бетона, залізобетона), тому стійкість споруди за ДБН В.1.1-7-2002 відповідає ступеню вогнестійкості II [88].

В разі виникнення пожежі встановлені датчики-сповіщувачі, які спрацьовують при підвищенні температури до 89°C. Для гасіння невеликих ділянок загорання при виключеному та включеному (до 1000В) електроустаткуванні застосовують вуглекислотні вогнегасники ОУ-5 (2 шт.) та порошкові ОП-10 (2 шт.).

Як стаціонарні засоби пожежогасіння встановлені самоспрацьовуючі вогнегасники САМ-9 (25 шт). У приміщенні, де розташовується установка, на відстані 30 метрів одне від одного встановлені пожежні гідранти з рукавами довжиною до 10 метрів. Відстань до пожежного виходу не більше 40 метрів. Відповідно до ДБН В.1.1-7-2002 кількість виходів - не менше двох. Ширина дверей евакуаційного виходу - 2 метри. Двері евакуаційного виходу відкриваються на зовні [88].

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Рекомендації з техніки безпеки. Відповідно до закону про охорону праці і національної програми по охороні праці, виробничі будівлі, споруди, устаткування, технологічні процеси відповідають вимогам, що забезпечують безпечні умови праці [88].

Адміністрації підприємств зобов'язані забезпечити належним технологічним устаткуванням усі робочі місця і створити на них умови роботи відповідно правилам по охороні праці.

У зв'язку з вищевикладеним пропонується дотримуватися наступних правил техніки безпеки й проводити наступний комплекс заходів щодо забезпечення електробезпеки на проектованій ділянці:

1) Для запобігання небезпеки ураження електричним струмом, устаткування повинне мати надійний металевий зв'язок корпусів електродвигунів, щитів, постів електроапаратури і сталевих труб електропроводки із заземлювальним контуром.

2) При експлуатації електроустаткування необхідно дотримуватися наступних правил безпечної роботи:

- забороняється доторкатися до електропроводів, робити ремонт електроустаткування, знімати й установлювати електролампи, запобіжники й інші деталі електроустаткування особам, які не мають права допуску;

- входити в розподільну щитову, відкривати електрозбірки, входити в місця, де висять таблички «Вхід заборонений», «Небезпечно для життя» й інші попереджувальні написи. Вхід дозволяється чітко обмеженому колу людей з дотриманням правил про допуск;

- для переносного освітлення користуватися лампами напругою не більше 12 В;

- перед проведенням ремонтних робіт на встаткуванні лінії електродвигуни повинні бути зупинені, знеструмлені й від'єднані від приводів, на пускових кнопках повинні бути вивішені плакати «Не вмикати, працюють люди». Відключення електроенергії проводиться електриком;

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						108
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

- відповідальний електрик за електрогосподарство лінії систематично перевіряє відповідність заземлення устаткування правилам технічної експлуатації, особливо після його ремонту;

- установлення плакатів і знаків безпеки.

Охорона навколишнього середовища. Заміна агресивних і канцерогенних екстракторів ліпідів з біомаси, таких як формальдегід в суміші з метанолом, на систему надкритичної екстракції значно зменшує антропогенне навантаження на навколишнє середовище і попереджає можливий викид забруднюючих речовин. До того ж, CO₂ у системі можна використовувати повторно за наявності обладнання з очистки та зрідження газу.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						109
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

ВИСНОВКИ

Було досліджено технологію одержання ліпідів мукових грибів серед порядку *Mucorales*, раціональні параметри культивування грибів для отримання ліпідів та описано технологічні рішення, необхідні для реалізації проектування.

Було виконано наступні завдання:

- Було проведено літературний огляд стосовно існуючих видів мукових, умов, параметрів їх культивування, а також біосинтез та існуючі технології одержання ліпідів. За проведеним оглядом літератури було обрано безперервне глибинне культивування мукових грибів виду *Cunninghamella japonica*.
- Було обрано та наведено раціональну технологію отримання ліпідів мукових грибів шляхом культивування на модифікованому середовищі Гудвіна з ліофільним висушуванням міцелію та надкритичною екстракцією ліпідів флюїдним CO₂. Підібрані оптимальні умови та параметри для культивування *Cunninghamella japonica* для отримання ліпідів. Культивування проводиться впродовж 4 днів у ферментері з механічним перемішувачем при рН=6,5±0,3 та температурі 29±0,5°C.
- Оскільки заплановано виробництво ліпідів в обсязі 2,5 т/добу було розраховано та запропоновано ферментер з номінальним об'ємом 50 м³ при коефіцієнті заповнення 0,65, лопатевою мішалкою зі швидкістю перемішування 1 об/с.
- Розроблено технологічну і апаратурну схеми культивування мукових грибів для одержання ліпідів, згідно обраних

					ЕКБ.БЕ6122.ДП		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шмигоськи			Висновки	Стадія	Арк.
Конс.		Левтун І.І.					
						110	124
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ	
Затверд.							

параметрів стадії культивування, та розроблено креслення ферментера.

- Було запропоновано пропозиції та заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля, згідно до ДСТУ та ДБН.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
						111
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Список використаної літератури:

1. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов. Феофилова Е.П., Алехин А.И., Гончаров Н.Г., Мысякина И.С., Сергеева Я.Э. М.: Национальная академия микологии, 2013, 152 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
3. Переведенцева Л.Г. П 27 Микология: грибы и грибоподобные организмы: учеб. пособие / Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009. – 199 с.: ил.
4. Сергеева Я.Э., Ивашечкин А.А., Алехин А.И., Андриянова Д.А., Гальченко В.Ф., Мысякина И.С., Галанина Л.А., Феофилова Е.П., Лунин В.В. Способ получения липидов. Заявка на патент РФ номер 2011104913.
5. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
6. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медицина. 1972. 180 с.
7. Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 501–519.
8. Андриянова Д.А., Сергеева Я.Э., Кочкина Г.А., Галанина Л.А., Усов А.И., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 48. № 4. С. 448–451.
9. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 750–755.
10. Тютюнников Б.Н. Химия жиров. М.: Пищпром, 1966. 632 с.

					ЕКБ.БЕ6122.ДП				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Шмиговський			Список використаних джерел		Стадія	Арк.	Акрушів
Конс.		Левтун І.І.							
								112	124
Керів.		Левтун І.І.					КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.									

11. Samson R. A. Revision of the genus *Cunninghamella* // Proceedings van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Section C. — 1969. — Т. 72, № 3. — С. 328.
12. Підоплічко Н.М. «Атлас мукоральних грибів» / Підоплічко Н.М., Мілько А.А. // Київ: «Наукова думка», 1971. — 187 с.
13. Белякова Г.А. «Водоросли и грибы: учебник для студ. высш. учеб.
14. Sarbhoy A. K. *Cunninghamella echinulata* // CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. — 1966. — Т. 103. — С. 1—2.
15. L.O. Donnell «Zygomycetes in Culture» // University of Georgia, 1979.p. 236.
16. Zhang, Sean X. «*Cunninghamella echinulata* causing fatally invasive fungal sinusitis» // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 76 (4), 2013. — p. 506–509.
17. Domsch «Compendium of Soil Fungi. Vol I.» / Domsch, Gams, HeidiAnderson, Traute // Academic Press, 1980. — p. 238.
18. Freitag D.G. «Stereoselective metabolism of rac-mexiletine by the fungus *Cunninghamella echinulata* yields the major human metabolites hydroxymethylmexiletine and p-hydroxymexiletine» / Freitag D. G; Foster R. T; Coutts R. T; Pickard M. A; Pasutto F. M // Drug Metab Dispos. 25 (6), 1997. — p. 685–692.
19. Гудзь С. П. та ін. Мікробіологія: підручник: (для студентів вищих навчальних закладів) / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. — 360 с.
20. Карпов О. В. Сучасні напрями в мікробіології. Конспект лекцій./ О. В. Карпов. — К.: НУХТ, 2004. — 84 с.
21. Клещев Н. С. и др. Общая промышленная биотехнология: Технология бродильных производств: Учеб. пособие / Н. С. Клещев, М. П. Бенько. —Х.: НТУ «ХПИ», 2007. — 200 с.

- 22.Климнюк С. І. та ін. Практична мікробіологія: Посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Широкобоков. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
- 23.Северин С.Е., Соловьева Т.А. Практикум по биохимии. – М. : МГУ, 1989. – 509 с.
- 24.Творогова М.Г. Липиды и липопротеины. Лабораторная диагностика нарушений липидтранспортной системы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 10. – С. 21–32.
- 25.Пат. 2413952 Российская Федерация, МПК G01N. Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови / Канская Н.В., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Спирина Л.В.;– № 2009103374 ; заявл.02.02.2009 ; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 7. – 7 с.
- 26.Пат. 2428698 Российская Федерация, МПК G01N. Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови [Текст] / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Степовая Е.А. ; инфекционными заболеваниями” (RU). – № 2010124210 ; за'явл. 11.06.2010 ; опубл. 10.09.2011, Бюл. № 27. – 8 с.
- 27.Пат. 2439575 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Позднякова И.А., Гузеева Т.И., Степовая Е.А. ;– № 2010124101 : заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 6 с.
- 28.Пат. 2439580 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова

Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Поздня' кова И.А., Гузеева Т.И., Понгольская Л.В. ; – № 2010124072 : за' явл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 5 с.

29.Пат. 2439581 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сер' дца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Поздня' кова И.А., Гузеева Т.И., Бойков А.Н. ;– № 2010124114 : заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 8 с.

30.Пат. 2439582 Российская Федерация, МПК G01N. Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сер' дца / Канская Н.В., Твердохлебов С.И., Пичугин В.Ф., Чернов А.С., Федорова Н.А., Канский А.В., Решетников В.И., Поздня' кова И.А., Гузеева Т.И., Бойков А.Н. ; – № 2010124116 : заявл. 11.06.2010 ; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 9 с.

31.Левицкий А.П., Гоженко А.И., Левченко Е.М. Влияние квер' тулина на содержание липидов в печени и в сыворотке кро' ви крыс с эндотоксемией // Актуальные проблемы транс' портной медицины. – 2013. – № 1(31). – С. 139–143.

32.Luque de Castro, M. D., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta, 369, 1–10.

33.Mamidipally, P. K., & Liu, S. X. (2004). First approach on rice bran oil extraction using limonene.European Journal of Lipid Science and Technology, 106, 122–125

34.Каухова, И. Е. Особенности экстрагирования биологически активных веществ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья /

- И. Е. Каухова // Растительные ресурсы. 2006. - Т. 42. - Вып. 1. - С. 82-91
- 35.Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P., & Veuthey, J. (2001). Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. Journal of Separation Science, 24, 865–873.
- 36.Gan J. Evaluation of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Analysis of Pesticide Residues in Soil [Text] / J. Gan, S. K. Papiernik, W. C. Koskinen, S. R. Yates // Environ. Sci. Technol - 1999. - Vol. 33 (18). - P.3249–3253
- 37.Okoh O. O. The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis* [Text] / O. O. Okoh, A. J. Afolayan // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. - 2011. - Vol.5(22)/ - P. 2474-2478.
- 38.Адекенов С.М. Экологически чистые технологии в производстве лекарственных препаратов. // Вестник КазНУ им.Аль-Фараби. Серия химическая. -2010. -№4(60). -С.216-220
- 39.Зилфакаров И.Н., Челомбитько В.А., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск, 2007. -155с.
- 40.Калиев А.Т., Бутабаева К.Ж., Тургумбаева А.А., Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш., Хаджиакбер А. Сверхкритическая флюидная СО₂ экстракция растений рода климакоптера и петрасимония //Вестник КазНУ. -2011.- №1 (61). -С.152154
- 41.Калиев А.Т., Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш., Абилов Ж.А. Сверхкритическая флюидная СО₂ -экстракция комплекса биологически активных веществ верблюжьей колючки киргизской

- alhagi ЫщЫвошш веЪгепк //Сб. межд. конф. "ЭОС-2010", Воронеж, 2010.- С.256
- 42.Залепугин Д. Ю., Тилькунова Н. А., Чернышова И. В., Поляков В.С. Развитие технологий, основанных на использовании сверхкритических флюидов //Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. -Том 1. -№1. -2006. -С.27-51
- 43.Sihvonen, M., Jarvenpaa, E., Hietaniemi, V., & Huopalahti, R. (1999). Advances in supercritical carbon dioxide technologies. Trends in Food Science and Technology, 10, 217–222.
- 44.Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. И др. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. – М.: Мир, 1994. Т.1. – с. Т.2. – с. Т.3. – с.
- 45.Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.: ил. – (Учеб. лит. для студентов мед. вузов).
- 46.Биохимия: Учебник /Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.: ил. (Серия «XXI век»).
- 47.Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1998. – 479 с.: ил.
- 48.Кольман Я., Рэм К-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469с.
- 49.Feofilova E.P., Sergeeva Y.E., Mysyakina I.S., Bokareva D.A.Microbiology (Mikrobiologiya). 2015. T. 84. № 2. C. 170-176.
- 50.Ratledge C. // Biochimie. 2004. V. 8. P. 807–815.
- 51.Ward O., Singh A. // Process Biochem. 2005. V. 4.P. 3627–3652.
- 52.Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 3. С. 325–339.
- 53.Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – 2003
- 54.Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. 1987Страниц:368
- 55.Leger, Bidochka, Roberts, 1994; James, 2001.

- 56.Искандаров, Гузалова, Давранов, 2006.
- 57.Полотебнова, Феофилова, Шадрина и др.,1987;
- 58.Морозова, Баранова, Козлов и др., 2001.
- 59.Морозова, Баранова, Козлов и др., 2001.
- 60.Полотебнова, Феофилова, Шадрина и др.,1987.
- 61.Dilon, Carnley, 1985
- 62.Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии. - учебное пособие.- Омск: ОГУС, 2015.-123 с.
- 63.Тихонов Г.П., Юдина Т.А. Основы биохимии. - учебное пособие.- М.: МГАВТ, 2014. - 179 с.
- 64.Zverlov V., Berezina O., Velikodvorskay G.A., Schwarz W.H. //Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, v.71, p.587-597.
- 65.Potocnik J. // Science, 2007, v. 315, p.310-311.
- 66.Ratledge C., Lipid and fatty acids, Primary products of metabolism, NY- London, 1978, p.263-296.
- 67.Russell, L. S., 2003, A Heritage of Light: Lamps and Lighting in the Early Canadian Home, University of Toronto Press.
- 68.Stahl P.D., Klug M.J., Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition, Appl.. Environ. Microbiol., v.62, No.11, p.4136-4146.
- 69.Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию. - учебник для вузов- М.: Изд. Центр «Академия», 2014.- 288 с. Чхенкели В.А. Биотехнология. - учебное пособие. - СПб.: Проспект науки, 2014. - 336 с.
- 70.Нетрусов А.И. Общая микробиология : учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – Москва : Академия, 2007. – 220 с.
- 71.Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы : учеб. пособие. – Санкт-Петербург : изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 147 с.

- 72.Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алехин А.И., Сергеева Я.Э., Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии (обзор), Прикладная биохимия и микробиология, 2012, Т.48, №1, С. 5-17
- 73.Лунин В.В., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Мысякина И.С., Ивашечкин А.А., Богдан В.И., Феофилова Е.П., Получение биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов, Прикладная биохимия и микробиология, 2013, Т. 49, №1, С. 1-8.
- 74.Богдан В.И., Коклин А.Е., Красовский В.Г., Лунин В.В., Сергеева Я.Э., Ивашечкин А.А., Феофилова Е.П., Получение метиловых эфиров жирных кислот – основы биодизельного топлива – из липидов мицелиальных грибов, экстрагированных сверхкритическим CO₂, Сверхкритические флюиды: теория и практика, 2013, Т.8, №4, С. 46-52
- 75.Ивашечкин А.А., Сергеева Я.Э., Богдан В.И., Сорокин В.В., Лунин В.В., Мысякина И.С., Феофилова Е.П. Влияние лигнина и кислорода на рост и липидообразование *Lentinus tigrinus*, Прикладная биохимия и микробиология, 2014, Т. 50, № 3, С. 318-323.
- 76.Асонов Н.Р. Микробиология / Н.Р. Асонов. – Москва : ВО Агропромиздат, 1989. – 230 с.
- 77.Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості : навч посібник / І. П. Данилов, С. І. Самойленко ; Нац. техн. ун-т "Харків. політехн. ін-т". – Харків : НТУ "ХПІ", 2008. – 272 с.
- 78.Калунянц К.А. Оборудование микробиологических производств / Калунянц К.А., Голчер Л.И., Балашов В.Е. -М. : Агропромиздат, 1987. - 400 с.

79. Саруханов А.В. Оборудование микробиологических производств. Справочник / Саруханов А.В., Быков В.А. — М.: Колос, 1993.-384 с.
80. Свитцов А.А. Основное ферментационное оборудование микробиологических производств: Учебное пособие / Свитцов А.А. — М.: МХТИ им. Д.И. Менделеева, 1987. —40 с.
81. Виестур У.Э., Кузнецов А.М., Савенков В.В. Системы ферментации. – Рига: Зинатне, 1986. – 174 с.
82. «Справочник технолога-машиностроителя» Т. 1 и 2. Под ред. А.Г.Косиловой и Р.К.Мещерякова. – 4-е изд., перераб. и доп. // М.: Машиностроение, 1985-1986. - 823 с.
83. Закон «Про охорону праці». Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12>
84. ДСН 3.3.6.037-99 «Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку». Режим доступу: <http://arm.te.ua/docs/DSN-3.3.6.037-99.pdf>
85. ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень». Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/rada/show/va042282-99>
86. Правила улаштування електроустановок, 2017р. Режим доступу: <https://ua.energy/wpcontent/uploads/2018/06/%D0%9F%D0%A3%D0%95.pdf>
87. ДСТУ Б В.1.1-36:2016 «Визначення категорій приміщень, будинків та зовнішніх установок за вибухопожежною та пожежною небезпекою». Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=65419
88. ДБН В.1.1-7-2002 «Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги». Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/docpage.html?id_doc=68456

					ЕКБ.БЕ6122.ДП	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		120

ДОДАТОК А

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ТА КВП

Позиція	Позначення, марка	Найменування	Кількість	Маса, кг	Примітка
Зм-1		Змішувач. Перемішування комбіноване – механічною турбінною мішалкою та повітрям через барботер, потужність електродвигуна з редуктором 9 кВт, частота обертання вала мішалки 1об/хв.	1		Неірж. сталь 12Х18Н 10Т
А-2		Автоклав. Місткість 20 м ³ , діаметр корпуса 2200 м ³ , максимальна температура 145 °С. Робочий тиск 0,3 мПа.	1		
К-3		Кювета. Товщина стінки 3 мм.	1		
Т-4		Термостат, ширина 600мм, висота 1600мм, температурний режим 5-60 °С, потужність 1,3 кВт	1		Неірж. сталь 12Х18Н 10Т

					ЕКБ.БЕ6122.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Додаток А	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Шмиговський						
Конс.		Левтун І.І.					122	124
Керів.		Левтун І.І.						
Затверд.								
						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		

Зм-5, Зм-6		Змішувач. Перемішування комбіноване – механічною турбінною мішалкою та повітрям через барботер, потужність електродвигуна з редуктором 9 кВт, частота обертання вала мішалки 1об/хв.	2		Неірж. сталь 12X18H10T
Фм-7	ВЕЕ	Ферментер. Місткість 50 м ³ . Перемішування механічне з турбінною мішалкою та барботером.	1		Неірж. сталь 12X18H10T
ВМ-8		Вакуум-фільтр. Площа фільтрації 10, діаметр барабана 2600мм, об'єм рідини в барабані 3500л.	1		Неірж. сталь 12X18H10T
Пз-9		Повітрозабірник, висота труби 10 м, діаметр труби 300мм.	1		
Ф-10		Повітряний фільтр для стерилізації повітря, що потрапляє в реактор, ефективність очищення - 80%, діаметр прозорів 2 мкм	1		Неірж. сталь 12X18H10T
КМ-11	900-31- 2	Компресор повітряний. Продуктивність 970 м ³ повітря /хв. Тиск на виході 0,34 МПа. Потужність електродвигуна 3500 кВт. Температура повітря на виході до 200 °С.	1		
ЛС-12		Ліофільна сушарка, довжина 3900мм, ширина 2200, діапазон робочих температур - 55 °С до +80 °С.	1		Неірж. сталь 12X18H10T

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

ЕКБ.БЕ6122.ДП

Арк.

123

Др-13		Дробарка. Продуктивність 20т/год, потужність 2 кВт, частота обертання валу 450 об/хв.	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
В-14		Випарник. Потужність 9,8 кВт, довжина 3000 мм, ширина 900 мм.	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Н-15		Насос. Максимальний напір: 10.0 (м), Пропускна здатність: 100.0 (м ³ /год), Напруга мережі: 380 ~ 400 В, Частота струму: 50 (Гц), Потужність (W): 18.8 (кВт).	9		Збірний
НЕ-16		Надкритичний екстрактор. Робоча температура до 80 °С, потік СО ₂ 50л/год, діапазон тиску 5-40 МПа.	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Сп-17		Сепаратор. Потужність 18,5 кВт, продуктивність 15 м ³ /год, довжина 1460 мм, ширина 1700 мм, висота 1900 мм.	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Зб-18		Збірник з вбудованим перемішуючим пристроєм, для накопичення та перемішування зброженої маси	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т